

MELENCOLIASI

TOX

lezioni di
tossicologia

a cura di

Piero Dolara

Firenze University Press



Piero Dolara

TOX: lezioni di tossicologia

Firenze University Press
2006

TOX : lezioni di tossicologia / Piero Dolara. – Firenze : Firenze university press, 2006.

(Electronica ; 17)

<http://digital.casalini.it/8884534127>

ISBN-10: 88-8453-412-7 (online)

ISBN-13: 978--88-8453-412-5 (online)

ISBN-10: 88-8453-413-5 (CD-Rom)

ISBN-13: 978-88-8453-413-2 (CD-Rom)

615.9 (ed. 20)

Tossicologia

Editing di Baldo Conti
Grafica e impaginazione di Sebastiana Minore

© 2006 Firenze University Press

Università degli Studi di Firenze
Firenze University Press
Borgo Albizi, 28
50122 Firenze, Italy
<http://epress.unifi.it/>

Printed in Italy

rox

indice

Indice

Prefazione _____	VIII
Considerazioni introduttive _____	2
Differenze tra popolazioni umane e popolazioni di animali da laboratorio _____	8
Attivazione metabolica _____	19
Prove di tossicità _____	26
Tossicologia genetica _____	36
Test di mutagenesi _____	53
Cancerogenesi sperimentale _____	61
Teratogenesi _____	70
Tossicità riproduttiva di farmaci e tossici _____	78
Danni cellulari da radicali liberi _____	83
Riduzione dell'apporto calorico e danno ossidativo _____	97
Epidemiologia _____	104
Epidemiologia descrittiva _____	114
Sostanze tossiche presenti negli alimenti _____	123
Nitrosamine, ammine eterocicliche e ammine aromatiche _____	133
Tossicologia del fumo di tabacco _____	143
Concetti generali sui pesticidi _____	152
Pesticidi anticolinesterasici, piretroidi, rotenone _____	158
Pesticidi clorurati _____	164
Bifenili, diossine, benzofurani policlorurati e polibromurati _____	171
Estrogeni ambientali _____	184
Idrocarburi policiclici aromatici _____	191
Metalli pesanti _____	199
Inquinamento dell'acqua _____	209
Inquinamento dell'aria _____	220
Lecture consigliate _____	237
Indice analitico _____	239

rox

prefazione

Prefazione

Quanto segue è un manuale elettronico (e-book), consultabile on line. Per chi non si rassegna all'abbandono della carta stampata, il libro può anche essere stampato in formato PDF. Il testo scritto è stato però concepito come una scarsa guida al materiale illustrativo delle figure e delle presentazioni in Powerpoint (accessibili nel dischetto accluso al libro), che contengono la maggior parte dell'informazione. Le presentazioni sono anche a disposizione dei colleghi come integrazione didattica.

Il testo è stato scritto da Piero Dolara, Ordinario di Farmacologia e Tossicologia (Facoltà di Farmacia, Università degli Studi di Firenze). Il materiale documentario delle presentazioni è stato preparato da Piero Dolara, con la collaborazione della Prof. Giovanna Caderni (tossicologia genetica, test di mutagenesi, tossicologia alimentare), della Dott. Lisa Giovannelli (danno ossidativo), della Dott. Cristina Luceri (PCB e TCDD) e della Dott. Giovanna Testa.

Il materiale dell'e-book è stato controllato e organizzato in forma elettronica da Sebastiana Minore della Firenze University Press, con grande professionalità e pazienza.

L'autore prende su di sé la colpa di ogni imprecisione che sia sfuggita alla revisione finale e di ogni affermazione influenzata da opinioni personali. Per trattazioni più classiche si rimanda ai libri di tossicologia internazionali disponibili sul mercato.

Nota. La numerazione segue lo stile delle pubblicazioni scientifiche internazionali (i decimali con il punto e le migliaia con le virgole).

L'approccio utilizzato in questo e-book ha le limitazioni tipiche dei moderni mezzi di comunicazione, di cui l'autore non si assume responsabilità. Un e-book è, infatti, una sorta di manuale a fumetti, che ricorda l'abitudine medioevale di spiegare cose complesse con affreschi e libri miniati, quando la maggior parte della popolazione era analfabeta.

Non è facile dire se l'abbandono del formato classico del trattato e il ricorso alle immagini, reso semplice dalla tecnologia elettronica, sia un passo in avanti o due passi indietro. Usando una strofa di un grande scrittore e pessimo poeta dell'Ottocento italiano: "ai posteri l'ardua sentenza".

Anni duemila: il gruppo di Tossicologia del Dipartimento di Farmacologia dell'Università di Firenze e **gli autori del libro e del materiale documentario**



Cristina Luceri

Giovanna Testa

Piero Dolara

Giovanna Caderni

Lisa Giovannelli

Anni mille: il primo testo (a fumetti) della Lingua Italiana "volgare", in un affresco della Basilica inferiore di San Clemente, Roma



rox

lezione n. 1

Considerazioni introduttive

La tossicologia è una scienza antica. L'origine del nome tossicologia è ancora incerto. Sembra però che la parola derivi dal termine greco toxos (τὸξος), che significa arco. Forse questo è un riferimento al veleno che alcune popolazioni antiche mettevano sulla punta delle loro frecce, anche se non si hanno notizie sull'uso di frecce avvelenate in Eurasia. Le frecce avvelenate con curaro erano infatti usate dagli Indios dell'Amazzonia, che avevano compreso il concetto di biodisponibilità: il curaro, mortale per via parenterale (la ferita da freccia), è innocuo per via orale.

Le testimonianze più antiche che riguardano la tossicologia sono contenute nel papiro di Ebers del 1552 avanti Cristo (**figura 1**). Concetti importanti di tossicologia, confermati dalla scienza moderna, sono già presenti nella cultura greca. Teofrasto e Dioscoride classificarono i veleni animali e vegetali e minerali e elencarono in modo specifico le piante velenose.

Dobbiamo però aspettare fino al Rinascimento per incontrare i primi tossicologi moderni, tra i quali ha un ruolo fondamentale Paracelso, grande medico e sperimentatore svizzero, vera incarnazione dello scienziato rinascimentale (**figura 2**). Si deve a Paracelso la moderna classificazione delle sostanze tossiche. "Tossico" è una sostanza chimica primaria e non una miscelazione di principi. Inoltre il tossico è un unicum con il farmaco. Infatti solo la dose distingue il farmaco dal tossico. Ogni farmaco ad alta dose diviene un tossico (ma oggi sappiamo che non è altrettanto vero che ogni tossico a bassa dose diventi un farmaco).

Figura 1
Papiro di Ebers

(Egitto, 1552 a.C., lunghezza: m 0.3x20)



Il papiro menziona le seguenti sostanze tossiche:

- cicuta
- aconito
- oppio
- piombo
- rame
- antimonio

Figura 2

Philippus Aureulus Theophrastus Bombastus Von Hohenheim (**Paracelso**) 1493-1541: un grande di nome e di fatto



La comprensione di questi concetti ha richiesto molti secoli di sperimentazione e di riflessione scientifica. Fino ad epoca recente erano usate in medicina sostanze tossiche come l'arsenico, basandosi sull'assunzione erronea che basse dosi di una sostanza tossica potessero beneficiare l'organismo, stimolando le difese dalle malattie come fanno alcuni agenti infettivi (figura 3). In altri casi sostanze tossiche come la cicuta erano usate come antitumorali (figura 4) in assenza di una tossicità selettiva per le cellule neoplastiche, adesso requisito fondamentale per ogni chemioterapico antitumorale.

Questi concetti sono illustrati nella figura 5, che descrive gli effetti di un farmaco o tossico in funzione della dose. La maggior parte delle curve dose-effetto hanno una forma sigmoidale: esiste cioè una dose che è sufficientemente bassa da non avere effetti, mentre aumentando questa dose gli effetti aumentano, fino a raggiungere una dose che esplica solo effetti tossici. Soggetti sensibili sono caratterizzati da una maggiore risposta a parità di dose, cioè da uno spostamento della curva dose risposta verso la sinistra. Ciò è una stessa dose provoca un effetto maggiore nel soggetto sensibile rispetto al soggetto resistente. Un corollario di questo concetto è rappresentato dall'occorrenza di effetti tossici in alcuni soggetti che manifestano effetti tossici a dosi che provocano solo effetti farmacologici nei soggetti normali o resistenti.

Figura 3

Esempi di tossici usati in passato come "tonici"
Arsenito di sodio (Merck-Boehringer, Knoll, Germania)
Museo del Dipartimento di Farmacologia



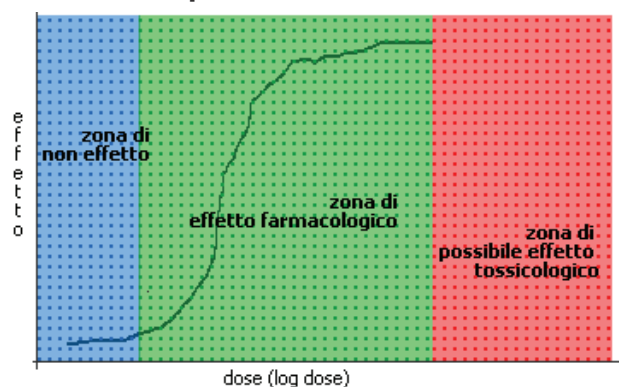
Figura 4

Esempi di tossici usati in passato come farmaci
Bromidrato di cicutina (conium maculatum). Istituto Nazionale di Chemioterapia, Milano (Museo del Dipartimento di Farmacologia, Firenze). È stato usato come antineoplastico



Figura 5

Curva-dose risposta classica



Esistono delle condizioni in cui le curve dose-effetto hanno una forma ad U (**figura 6**). Cioè esistono dosi ottimali di una sostanza alle quali un soggetto risponde con il mantenimento delle condizioni di salute. Quando la dose aumenta o diminuisce al di sopra o al di sotto del range ottimale si realizzano condizioni patologiche. Questo è ad esempio il caso di alcune vitamine, come la vitamina A (**figura 6**). Questa vitamina ha una dose ottimale al di sopra e al di sotto della quale si ha tossicità. Nell'uomo si verifica una condizione di benessere quando la dose di carotenoidi è compresa tra 0.1 e 0.8 mg/dì (**figura 7**). Dosi inferiori si associano ad avitaminosi e dosi superiori a una condizione di tossicità grave, con alterazioni cutanee, epatiche, disturbi del sistema nervoso centrale, fino al coma e alla morte (**figura 8**).

La tossicologia si occupa degli effetti avversi di trattamenti chimici e fisici su esseri viventi. Le specializzazioni della tossicologia sono la tossicologia sperimentale (che si occupa di esperimenti condotti su animali), la tossicologia cellulare, la tossicologia biochimica (che si occupa dello studio dei meccanismi di azione delle sostanze tossiche), la tossicogenomica e la tossicogenetica (che studiano gli effetti delle sostanze tossiche in funzione del patrimonio genetico) e infine la tossicologia clinica.

La sperimentazione animale è ancora molto importante in tossicologia. La sperimentazione animale consente, infatti, di prevedere effetti su popolazioni umane mediante lo studio di una sostanza su popolazioni di animali da esperimento.

Figura 6
Curva dose-risposta individuale per i carotenoidi

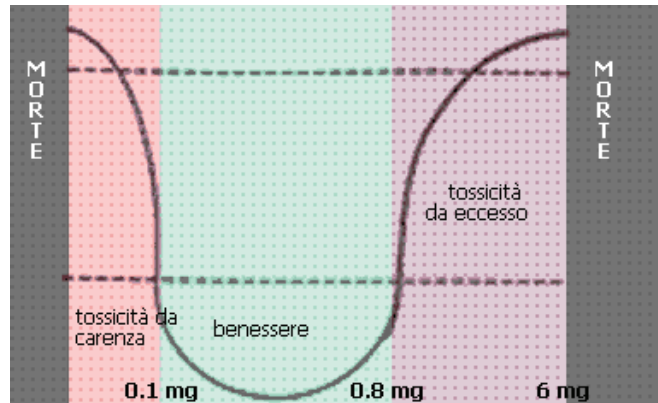
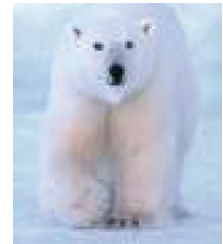


Figura 7
Tossicità del retinolo e beta-carotene, in 100 g di carote:

- retinolo ~ 1.15 mg
- beta carotene 6.8 mg
- dose tossica ~ 6 mg/die
- **dose raccomandata 800 µg di retinolo equivalente per giorno**

Figura 8
Sindrome dell'orso polare
(dosi elevate di beta-carotene di fegato di orso):

- alterazioni cutanee
- alterazioni epatiche
- disturbi del SNC
- coma e morte



Il numero di animali da esperimento che viene utilizzato nei paesi scientificamente sviluppati per studi sperimentali è relativamente elevato. Il vantaggio della sperimentazione animale consiste nel fatto che la maggior parte degli animali da esperimento (per es. i roditori, come ratti e topi) ha un ciclo vitale breve (2 o 3 anni) e ciò consente di ottenere risultati sperimentali in un tempo relativamente breve (**figura 9**).

Inoltre gli animali da esperimento hanno l'ulteriore vantaggio di avere caratteristiche individuali simili, al contrario delle popolazioni umane che sono geneticamente molto complesse, ed hanno caratteristiche fenotipiche assai variabili (**figura 10**).

La **figura 11** contiene alcune informazioni sul numero di animali da esperimento utilizzati in USA nella tossicologia sperimentale.

La **figura 12** illustra la percentuale di lavori scientifici pubblicati dal gruppo di Tossicologia del Dipartimento di Farmacologia di Firenze usando animali da esperimento.

Figura 9

Un esempio dei vantaggi della sperimentazione animale: studi sulla cancerogenesi del colon

- latenza di induzione di tumori del colon nel ratto: 0.5-1 anno
- latenza di induzione di tumori del colon umani: 40-80 anni
- durata media di uno studio clinico per la riduzione dei polipi del colon: 3-5 anni



Figura 10

Il gruppo di tossicologia e genomica dell'Università di Firenze



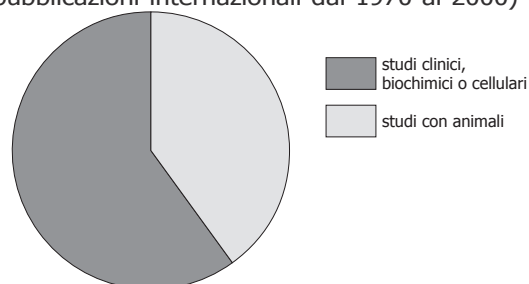
Figura 11

Uso di roditori (milioni) in ricerche sperimentali in USA

	1986	1988	1989
topi	3.9	3.5	3.8
ratti	1.8	2.0	2.3

Figura 12

Sperimentazione animale e non del gruppo di Tossicologia del Dipartimento di Firenze (circa 100 pubblicazioni internazionali dal 1970 al 2000)



Il numero di animali da esperimento è esponenzialmente aumentato nel secolo XX (figura 13). La maggior parte è rappresentata da roditori (figura 14).

La situazione in Italia è riassunta dalle figure 15, (anni 2000) e figura 16 (anni 1998-2000).

In epoca recente il numero di animali da esperimento si sta riducendo, sia per l'alto costo della sperimentazione sia per l'emergere di obiezioni alla sperimentazione animale da parte di gruppi dell'opinione pubblica, particolarmente attivi in paesi dell'Europa del nord (figura 17).

Non è superfluo ricordare che una qualunque decisione contraria alla sperimentazione animale dovrebbe per coerenza includere anche l'abolizione di qualunque forma di allevamento e di uso alimentare di animali. Infatti, le condizioni degli animali utilizzati a scopo alimentare sono spesso assai spiacevoli e mediamente peggiori di quelle degli animali destinati ad uso sperimentale.

Le leggi italiane, in armonia con le disposizioni europee, consentono la sperimentazione animale per fini di ricerca nei laboratori universitari o in laboratori privati abilitati, con attrezzature e controlli veterinari adeguati. Qualunque sperimentazione è soggetta ad autorizzazione di un comitato etico locale, che è tenuto a richiedere particolari permessi per sperimentazioni che possono disturbare gli animali da esperimento. L'attenzione al benessere degli animali da esperimento è sicuramente aumentata negli ultimi anni come effetto di un diverso atteggiamento culturale nei confronti della sperimentazione animale.

Figura 13
Animali sperimentali usati in Gran Bretagna

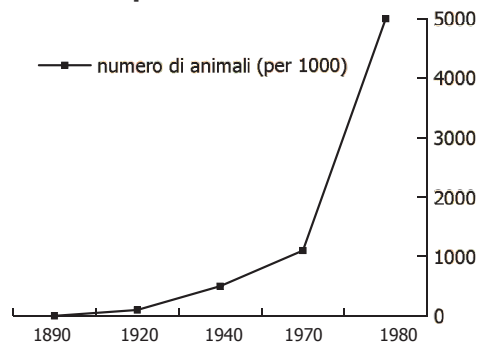


Figura 14
Tipi di animali da esperimento utilizzati nella CEE ('99)

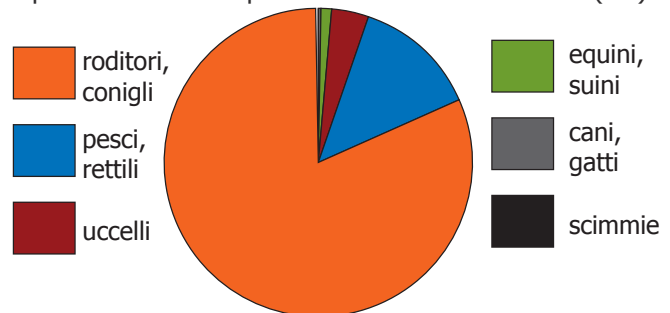


Figura 15
Tipi di animali da esperimento utilizzati in Italia (2000)

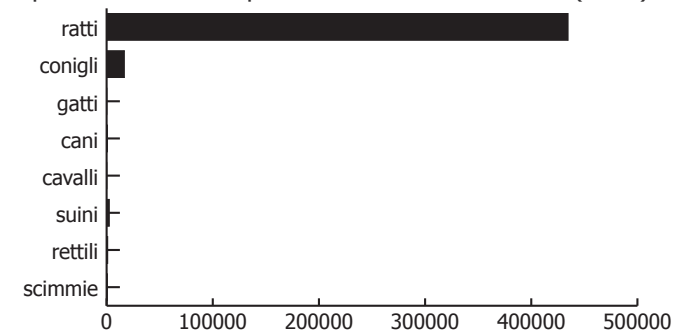


Figura 16
Tipi di animali da esperimento utilizzati in Italia (1998-2000)

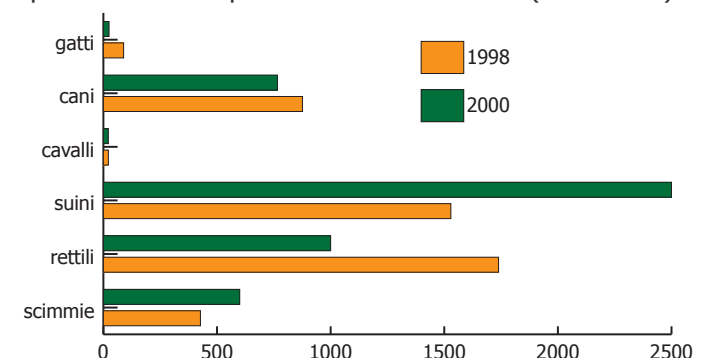
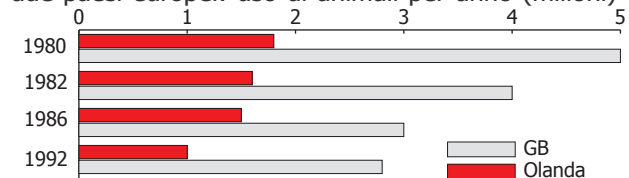


Figura 17
Recenti tendenze nella sperimentazione animale in due paesi europei: uso di animali per anno (milioni)



rox

lezione n. 2

Differenze tra popolazioni umane e popolazioni di animali da laboratorio

Le popolazioni umane sono contraddistinte da numerose caratteristiche peculiari: rispetto alle popolazioni di animali da esperimento, le popolazioni umane hanno grandi dimensioni numeriche. La variabilità sperimentale delle popolazioni umane è notevole e di solito l'esecuzione di una ricerca richiede tempi sperimentali lunghi. Inoltre le variabili che interessano gli esseri umani sono molteplici e spesso molto difficili da controllare. Per esempio, la salute umana è influenzata da fattori complessi quali il reddito, l'alimentazione, l'esercizio fisico, l'ambiente naturale, ecc. Al contrario gli animali da esperimento sono mantenuti in condizioni costanti e ogni variabile è controllata e variata a piacimento dallo sperimentatore.

Le ragioni dell'estrema variabilità delle popolazioni umane ha un'origine conosciuta, come si vede nella **figura 1**. Infatti, l'uomo e la donna moderni derivano da un nucleo di *Homo sapiens* che uscirono dall'Africa tra 100 e 200.000 anni fa, colonizzarono all'inizio la costa meridionale dell'Asia, arrivando successivamente fino all'Australia; successivamente si spinsero nel centro dell'Asia, per poi raggiunger l'Europa e l'America settentrionale e meridionale (passando per lo stretto di Behring che era probabilmente ancora una lingua di terre emerse).

Questa storia complessa è stata ricostruita dalla scienza moderna, con metodi genetici complessi di analisi delle popolazioni, ed è adesso possibile identificare specifiche popolazioni e misurare le

Figura 1
Le migrazioni dell'*Homo sapiens*



analisi delle componenti principali). Come si può vedere nella **figura 3 a sinistra**, che corrisponde alla componente principale numero uno, esiste una zona distinta in corrispondenza della Sicilia (in particolare della zona orientale), della Calabria e della Puglia. Queste zone corrispondono agli stanziamenti della Magna Grecia e quindi sono da spiegarsi con la persistenza di caratteri genetici delle popolazioni che si stabilirono nel sud dell'Italia circa 2500 anni fa. Nella **figura 3 a destra**, che descrive la seconda componente principale, si può osservare un'ampia zona più scura corrispondente al centro Italia. Questa zona ancora porta tracce genetiche delle popolazioni etrusche, che provenivano dall'Asia minore e che si stabilirono in Italia circa 3000 anni fa (come diceva, a ragione, il grande Erodoto). Si notano nelle due mappe zone di diversità genetiche in corrispondenza con la Val d'Aosta ed il Piemonte, probabilmente dovute ad antichi stanziamenti di popolazioni galliche e liguri.

Al contrario delle popolazioni umane, le popolazioni di animali da esperimento derivano da ceppi di animali cosiddetti "selvaggi" (wild), che furono isolati per usi di ricerca nel corso del XX secolo e che sono da allora riprodotti in laboratorio, spesso in condizioni di consanguineità (ceppi inbred). Pertanto la loro struttura genetica è estremamente omogenea.

Gli animali da laboratorio sono utilizzati in tutti i settori della medicina, farmacologia e tossicologia sperimentale. Di gran lunga i più importanti sono ratti e topi, che vengono utilizzati in quanto di piccole dimensioni e di facile uso sperimentale.

Nella **figura 4** sono riassunti i principali usi di questi roditori. Ancora importanti nella pratica sperimentale sono i conigli che vengono utilizzati soprattutto per lo studio di sostanze tossiche, di malattie muscolari e per la simulazione nell'animale dell'arteriosclerosi umana. Sono ancora molto utilizzati i maiali (per la chirurgia sperimentale e per i trapianti) ed i gatti in studi sul sistema nervoso centrale. Esistono infine animali che vengono utilizzati per scopi molto particolari, che vengono riassunti nella **figura 5**.

Può essere interessante anche ricordare che molte delle conoscenze sui meccanismi della memoria sono state ottenute su una lumaca di mare (*Aplysia*), che sicuramente molti tra noi (sbagliando) considerano un animale assolutamente primitivo e irrilevante (**figura 6**).

Le caratteristiche fondamentali che in parte spiegano la popolarità degli animali da esperimento nella pratica scientifica sono la bassa variabilità individuale, la possibilità di condurre sperimentazioni in tempi brevi (ad esempio un esperimento di tossicità cronica "a vita" dura nei roditori un massimo di due anni), la possibilità di controllare integralmente le condizioni ambientali di stabulazione (temperatura, luce, alimentazione, esercizio fisico).

Una delle imprecisioni che spesso vengono ripetute dagli animalisti è che le sperimentazioni con animali da esperimento non consentono di prevedere la tossicità dei composti sperimentati su popolazioni umane. Spesso si cita il caso della talidomide, che provocò malformazioni gravi nonostante fosse stata sperimentata con animali da laboratorio.

Figura 4

Comune utilizzo degli animali di laboratorio.

Ratti e topi:

- cancerogenesi
- studi genetici
- ipertensione
- diabete
- invecchiamento
- immunità



Figura 5

Usi insoliti di alcune specie di animali di laboratorio

- **armadillo:** lebbra
- **aragosta:** studi sulla funzione neuronale
- **marmotta:** epatite virale
- **chiocciola di mare (*Aplysia*):** studi sulla memoria

Figura 6

Una lezione di umiltà: capire l'intelligenza studiando ... una lumaca



In quel caso il disastro fu dovuto all'uso per i test di tossicologia preclinica di una specie di ratti che era per caso resistente agli effetti teratogeni della talidomide (figura 7).

Come è spiegato nella figura 8 sono molteplici i casi di sostanze chimiche per le quali lo studio di tossicità sperimentale negli animali avrebbe consentito nel passato di evitare gravi conseguenze nell'esposizione a queste sostanze di popolazioni umane.

La figura 9 mostra una serie di esempi nei quali la sperimentazione animale ha consentito di prevedere la tossicità umana di farmaci (e quindi di poterla prevenire).

Può essere interessante menzionare che le manipolazioni di mammiferi mediante ingegneria genetica hanno consentito in questi anni di creare modelli di roditori transgenici (in particolare topi) nei quali è possibile indurre mutazioni specifiche, o mettere fuori funzione geni, o introdurre geni che codificano per proteine umane, consentendo in tal modo la creazione di sindromi patologiche molto vicine alle patologie spontanee umane. La figura 10 presenta un esempio di topi con mutazione del genere ob (da obesità), che vengono usati per studiare le malattie umane da ipernutrizione.

Quanto detto non deve naturalmente far dimenticare che ogni specie animale ha caratteristiche proprie.

Figura 7

Un caso celebre d'una opportunità mancata (anni '50)



La **talidomide** induce focomelia negli esseri umani, ma non in alcune specie di ratto

Figura 8

- **glicole dietilenico**: tossicità renale (1930 ca); la sostanza è tossica anche per ratti e cani
- MTPP: **morbo di Parkinson** (1960 ca); la sostanza è tossica anche per scimmie e ratti

Figura 9

- **acido retinoico**: alterazioni dello sviluppo del tubo neurale; la sostanza è tossica anche per ratto, cane, scimmia
- **AZT**: depressione midollare; la sostanza è tossica anche per ratto, cane e scimmia
- **ciclosporina**: nefropatia; la sostanza è tossica anche per ratto e cane
- **ciclofosfamide**: cistite emorragica; la sostanza è tossica anche per ratto e cane

Figura 10

Malattie del ratto che danno informazioni sulle patologie umane



topi ob/ob, per diabete e obesità: disregolazione del controllo della leptina sui processi metabolici

La **figura 11** mostra che, confrontando tra loro gli umani e le più comuni specie di laboratorio, ci sono importanti differenze nel peso del fegato, nel flusso di sangue al fegato e al rene. Queste differenze sono la regola e devono essere considerate tutte le volte che si utilizza un dato sperimentale per prevedere gli effetti su popolazioni umane. Tali differenze non possono comunque annullare le più importanti somiglianze che caratterizzano i mammiferi, con l'eccezione del funzionamento del sistema nervoso centrale, che ha caratteristiche peculiari nell'*Homo sapiens*.

Anche da un punto di vista tossicologico i mammiferi usati sperimentalmente possono fornire importanti informazioni sul destino delle sostanze chimiche: nella **figura 12** si vede come un semplice parametro cinetico (l'emivita, cioè il tempo di dimezzamento di una sostanza nel plasma) è ben correlata tra ratto ed è uomo, con qualche eccezione (alcune sostanze come il TCDD e il PCB hanno nel ratto un comportamento cinetico diverso).

La **figura 13** mostra un altro fenomeno interessante: esistono casi di tossicità che vengono definiti specie-specifici. Esistono cioè casi nei quali la tossicità misurata in un roditore non ha corrispondenza in popolazioni umane: ad esempio il testosterone ha una tossicità elevata nel ratto, dove provoca danni renali gravi, ma la stessa sostanza non provoca alterazioni renali nell'uomo (anche se ha certo importanti effetti!).

Un altro aspetto che deve essere considerato quando si studiano gli effetti di un trattamento sperimentale è l'alimentazione (**figura 14**).

Figura 11
Variabilità dei parametri biologici tra specie diverse

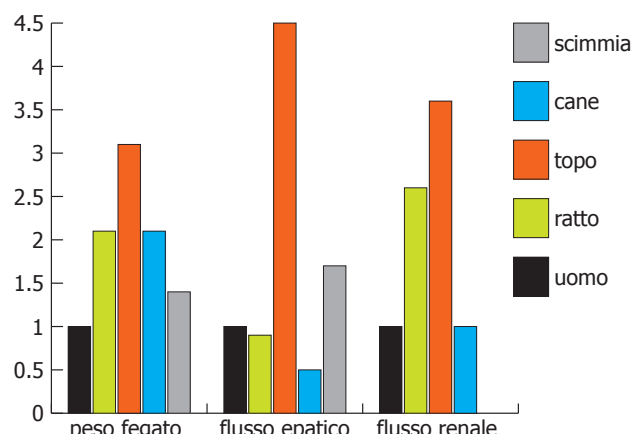
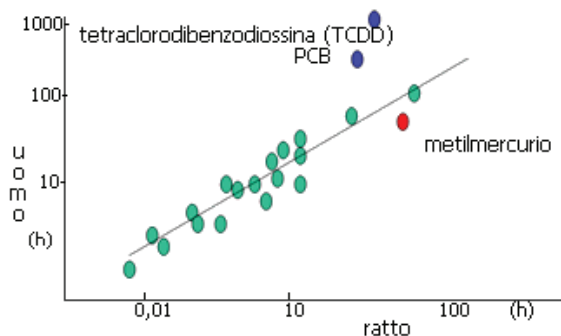


Figura 12
Correlazione tra emivita nell'uomo e nel ratto di tossici



Da Salver et al., *Env. Health Persp.* 105, 515-518, 1997, modificato

Figura 13
Esempi di tossicità selettiva specie-specifica: **androgeni**

- tipo di tossicità: renale
- struttura: tubulo
- specie sensibile: ratto

Figura 14
Differenza di alimentazione tra mammiferi e esseri umani



Infatti, gli esseri umani hanno una dieta estremamente varia (**figura 14, a destra**), il che produce importanti differenze rispetto agli animali alimentati con pellet standardizzante (**figura 14, a sinistra**). Inoltre le popolazioni di animali da esperimento, almeno da giovani, hanno mediamente un contenuto di lipidi corporei basso (**figura 15**). Ciò varia considerevolmente la cinetica delle sostanze che hanno affinità per i lipidi (tra queste molte sostanze tossiche). In conclusione la maggior parte delle sperimentazioni con animali da laboratorio forniscono informazioni interessanti sulla farmacologia e tossicologia delle sostanze chimiche, purché la sperimentazione non sia fatta da sadici o da imbecilli.

Vediamo adesso quali sono i parametri mediante i quali è possibile studiare la variabilità di una popolazione.

Le popolazioni più comuni hanno una distribuzione che viene definita Gaussiana; studiando un parametro variabile (ad esempio l'altezza), se si divide la popolazione in classi (ad esempio tutti coloro tra m 1.50-1.60, quelli tra m 1.60-1.70 e così via), un numero diverso di soggetti apparterrà ad ogni classe.

Ad esempio in una certa classe di studenti ci saranno cinque soggetti di altezza 1.50, 20 di altezza 1.70 e 6 di altezza 1.80 e così via. Se il campionamento è abbastanza preciso e il numero di soggetti campionati tende all'infinito, mettendo sull'asse delle y il numero di soggetti per ogni classe, si avrà una distribuzione gaussiana, cioè una distribuzione simmetrica con un minimo, un punto medio o media, un punto massimo

(**figura 16**).

Figura 15
Differenza di contenuto di lipidi corporei tra due specie di mammiferi (lipidi medi in esemplari giovani)

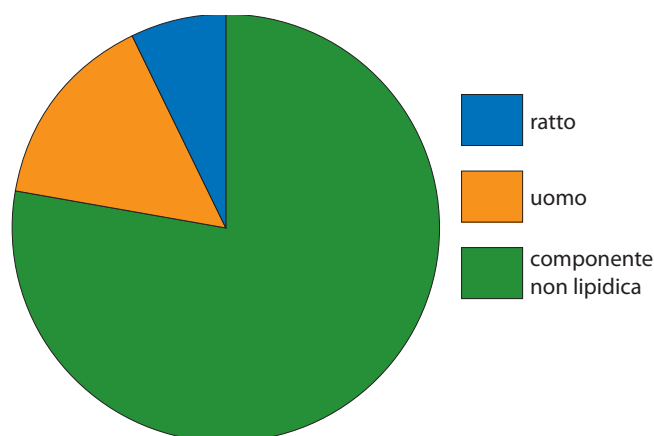
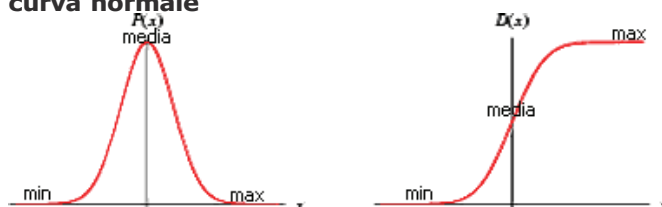


Figura 16
Distribuzione di frequenza: curva di Gauss o curva normale



Per definire le caratteristiche di una popolazione di questo genere, possiamo prendere il punto centrale (la media) che sarà uguale alla somma delle misure divisa per il numero delle osservazioni. Ma la misura che rende conto in maniera precisa della variabilità è la cosiddetta deviazione standard (**figura 17**): questa viene definita come SD o sigma ed è la radice quadrata della sommatoria delle differenze tra ogni osservazione e la media al quadrato, divisa per il numero delle osservazione media medesime (**figura 18**). La radice quadrata è necessaria per riportare la misura della SD in scala con le osservazioni originali. La deviazione standard SD è una misura fondamentale per capire la struttura di una popolazione, perché il 95% della popolazione è compresa tra la media e due deviazioni standard (**figura 19**). Conoscendo la deviazione standard e la media è quindi possibile visualizzare la struttura della popolazione. Nella **parte destra della figura 19** è rappresentata una distribuzione normale nella quale ogni classe include anche la somma delle classi precedenti (ossia l'integrale della funzione gaussiana da 0 a quel punto). Questa funzione è detta sigmoide ed è caratteristica di tutte le risposte dose-effetto e delle risposte tossicologiche e farmacologiche classiche.

Un'altra misura utile di dispersione di una popolazione intorno alla media è il coefficiente di variazione (cioè il rapporto tra SD e media espresso in %) (**figura 20**), che consente di paragonare la variabilità di più popolazioni, anche con medie diverse. Una popolazione sarà tanto più disomogenea quanto più alto è il coefficiente di variazione.

Figura 17

Parametri statistici di una popolazione

La **Deviazione Standard (SD, DS)** descrive la variazione della popolazione intorno alla media

$$SD, DS = \sigma$$

Figura 18

Concetto di deviazione standard, SD, σ

$$SD, \sigma = \sqrt{\frac{S(x_1 - \mu + \dots + x_n - \mu)^2}{n - 1}}$$

Figura 19

Distribuzione di frequenza: curva di Gauss, o curva normale

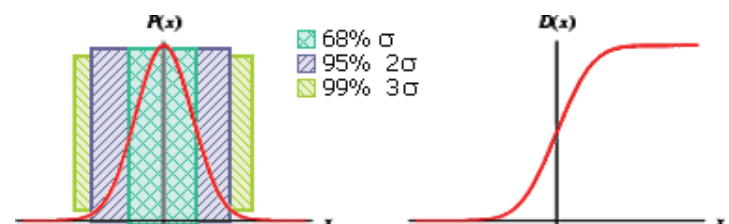


Figura 20

Parametri statistici di una popolazione

- il coefficiente di variazione (CoV) è il rapporto tra la deviazione standard e la media ($\times 100$) ed esprime la variabilità di una popolazione normalizzata sulla media
- i CoV consentono la comparazione della variabilità tra popolazioni con medie diverse

Altri modi intuitivi per rappresentare la variabilità sono il range, nel quale si riporta il valore minimo e massimo di una popolazione (**figura 21**) oppure il rapporto tra valore massimo e media (**figura 22**). Questi parametri sono meno precisi perché sono molto influenzati dai cosiddetti outliers (cioè da individui fuori dalla norma).

In conclusione, conoscendo la media e la deviazione standard è possibile capire se la popolazione è omogenea o disomogenea. Popolazione omogenee hanno una deviazione standard piccola e quindi un coefficiente di variazione basso e anche un basso rapporto tra valore massimo e media.

Può adesso risultare interessante esaminare i dati della **figura 23** nella quale si utilizza il coefficiente di variazione per studiare la variabilità ad una serie di farmaci e additivi: come si può vedere il coefficiente di variazione è intorno al 50% per molti farmaci della figura; esistono però delle sostanze (ad esempio il ciclamato) per le quali la variabilità di metabolismo può anche essere molto elevata (fino al 500% di coefficiente di variazione).

In conclusione, le risposte farmacologiche o tossicologiche delle popolazioni umane sono molto variabili, e in genere più variabili delle risposte delle popolazioni di animali sperimentali. Le basi biologiche della variabilità delle risposte farmacologiche e tossicologiche sono schematizzate nella **figura 24**. La variabilità genetica può provocare, infatti, variazione del numero o della conformazione dei recettori, del numero o della conformazione dei trasportatori, o degli enzimi che sono addetti al metabolismo dei farmaci

Figura 21

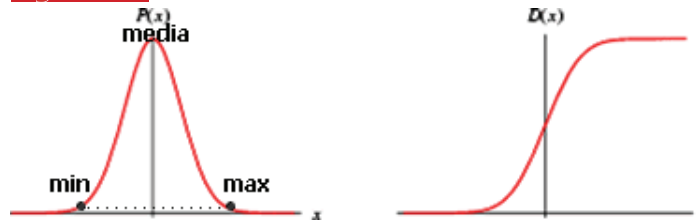


Figura 22



Figura 23

Variabilità ai farmaci in una popolazione umana

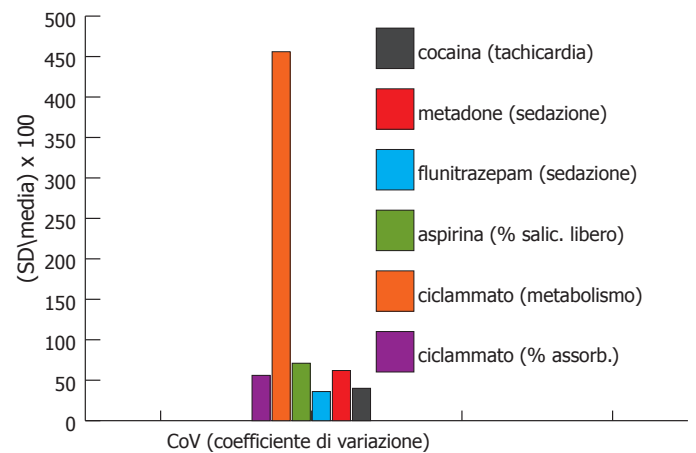


Figura 24

Origini della variabilità umana nella risposta farmaco-tossicologica

- variazioni dei recettori
- variazioni dei trasportatori
- variazioni del metabolismo

o dei tossici. La base biologica di queste variazioni è adesso apprezzata con maggiore precisione. Si conoscono ad oggi milioni di polimorfismi di singoli nucleotidi in geni diversi che si traducono in variazioni di proteine e quindi della funzione di enzimi, di canali, di trasportatori, di strutture cellulari. Ognuna di queste variazioni ha effetti importanti sull'effetto dei farmaci e dei tossici. Infatti, ognuna di queste variazioni, da sola o in combinazione con le altre, può portare a variazione del metabolismo, dell'assorbimento, dell'escrezione di una sostanza o dei target cellulari d'effetto, e ciò si traduce in una variazione della risposta farmacologica o della tossicità.

Appare quindi evidente che, pure all'interno di una sostanziale somiglianza di struttura genetica, esistono importanti variazioni individuali nell'effetto di farmaci e dei tossici, che è possibile comprendere con i metodi della biologia molecolare moderna. Questa variabilità è un'importante forma di difesa con la quale le popolazioni si adattano alle variazioni ambientali (figura 25).

Figura 25.
Vigore degli ibridi



rox

lezione n. 3

Attivazione metabolica

L'attivazione metabolica è un processo mediante il quale una sostanza chimica, di per sé biologicamente inerte, viene trasformata in una sostanza tossica dal metabolismo cellulare. Questo meccanismo non è sempre la regola. Esistono, infatti, sostanze che sono tossiche di per sé (ad esempio le tossine dell'*Amanita phalloides*, falloidina ed amanitina), cioè che non necessitano di attivazione metabolica; tuttavia numerose sostanze, e tra queste molti cancerogeni e mutageni (che vengono perciò definiti "procancerogeni" e "promutageni") diventano reattive dopo una o più trasformazioni chimiche ad opera di enzimi cellulari. Questi meccanismi di attivazione metabolica dei tossici e dei cancerogeni sono stati scoperti grazie alle ricerche dei coniugi Miller (figura 1), dell'Università di Madison (Wisconsin, USA) negli anni '70. Le trasformazioni chimiche catalizzate da alcuni enzimi cellulari trasformano un composto inattivo in un intermedio "elettrofilo", cioè carente di elettroni, spesso instabile, che si lega alle macromolecole (figura 2).

Ad esempio il dimetilamminoazobenzene (DAB), potente cancerogeno, viene demetilato con la formazione di un gruppo amminico elettrofilo (figura 3). I principali gruppi accettori di agenti elettrofili all'interno della cellula, detti anche "gruppi nucleofili", sono aminoacidi o basi del DNA e RNA (figura 4). L'attacco a questi gruppi degli agenti elettrofili porta a inattivazione di proteine, alterazione e inattivazione dell'RNA e a mutazioni del DNA.

Figura 1

James e Elizabeth Miller. Wisconsin, USA, 1970



Figura 2

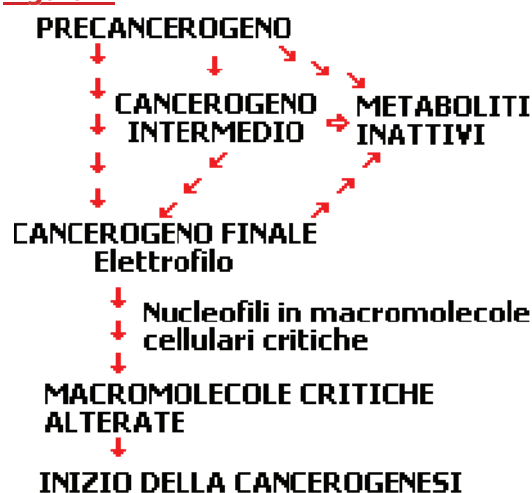


Figura 3

Metabolismo del dimetilamminoazobenzene

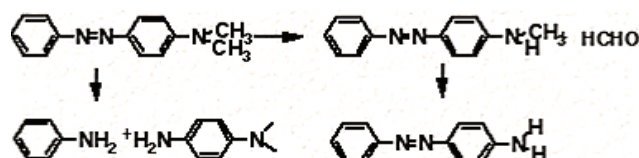


Figura 4

Gruppi nucleofili presenti in proteine e acidi nucleici suscettibili all'attacco di elettrofili

GRUPPO	PRESENTE IN:
>S:	METIONINA
$-\text{S}^-$	CISTEINA
>N:	(ISTIDINA (N-1, N-3) GUANINA (N-7) ADENINA (N-1 N-3) CITOSINA (N-3)
>C:^-	TIROSINA (C-3) GUANINA (C-8)
>C:O^-	GUANINA (C-6)

Molte delle reazioni d'attivazione sono conseguenza dell'ossidazione di xenobiotici da parte del citocromo P450, un sistema enzimatico redox contenente ferro capace di ossidare numerose sostanze (**figura 5**). Questi enzimi contengono il ferro legato ad un gruppo eme (**figura 6**), sono presenti in quasi tutte le cellule (in particolare nel fegato, rene, mucosa del tratto digerente e macrofagi), dove sono localizzati nel reticolo endoplasmico liscio (**figura 7**) e sono evolutivamente molto antichi. Infatti, con alberi genealogici molecolari ricostruiti sulla base delle divergenze delle strutture genetiche, si è calcolato che la loro apparizione sulla terra è coincidente con le prime forme cellulari (**figura 8**). Circa un miliardo di anni fa si sono ulteriormente evoluti; 300 milioni di anni fa sono apparsi i sottogruppi principali ancora presenti nelle cellule di mammifero (**figura 8**).

Figura 5

Caratteristiche dei citocromi P450 (CYP450)

- contengono un eme legato in maniera non covalente
- sono proteine di membrana
- usano l'ossigeno molecolare per ossidare il substrato
- sono contenuti nei mitocondri dove hanno funzione di sintesi degli steroidi e nel reticolo endoplasmico (MFO, mixed function oxidases)

Figura 6

Struttura del gruppo eme

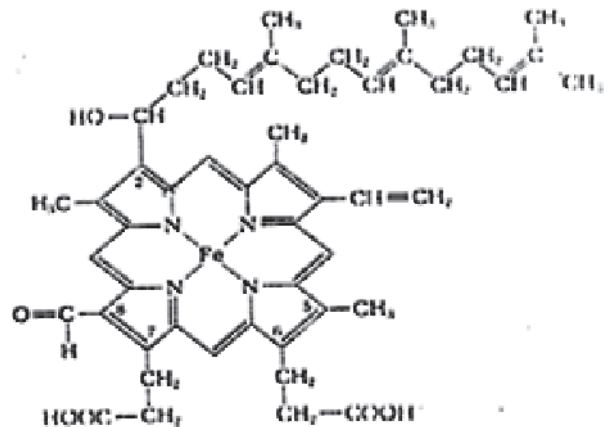
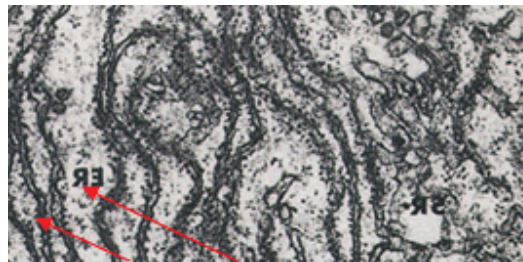


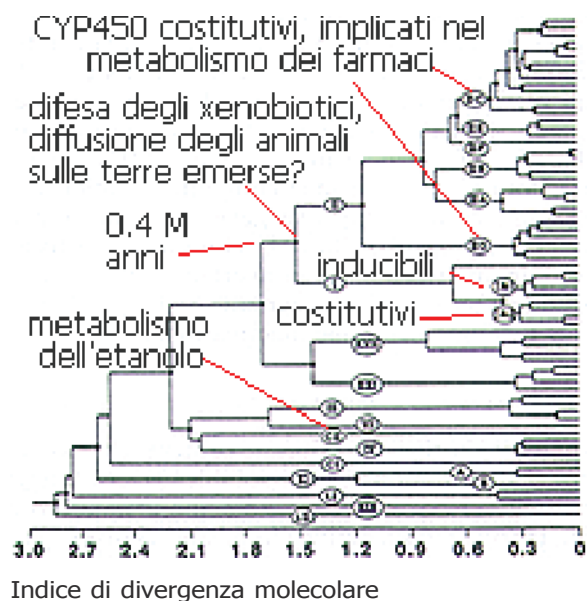
Figura 7



Microscopia elettronica del reticolo endoplasmico liscio (ER) (fegato)

Figura 8

Albero genealogico dei CYP P450



I CYP450 sono associati ad altri enzimi ossido-riduttivi (**figura 9**), con i quali formano un ciclo nel quale il ferro passa da bi- a trivalente e l'ossigeno viene usato per ossidare i diversi substrati (**figura 10**); sono enzimi inducibili da parte di alcuni xenobiotici ad es. TCDD, fenobarbitale (**figura 11**), mediante l'interazione di questi con un recettore citoplasmatico detto recettore Ah, cioè recettore per gli aril-idrocarburi (come il metilcolantrene, MC), che regola la sintesi di proteine nucleari e di citocromi P450.

Una cellula indotta può avere livelli di monossigenasi P450 anche 50 volte più elevati rispetto ad una cellula non indotta (**figura 12**). Questi enzimi sono spesso polimorfi (cioè presentano singole sostituzioni aminoacidiche) ed hanno diversa attività catalitica. Si pensa che questa possa essere una delle ragioni di differenze individuali nella risposta ai tossici: ad esempio esistono dei polimorfismi, detti m1, caratterizzati da una maggiore attività delle monossigenasi, che si pensa siano associati ad un più elevato rischio di cancro al polmone per una maggiore attivazione metabolica di cancerogeni come gli idrocarburi policiclici aromatici (PAH) (**figura 13**).

Figura 9
Assemblaggio del sistema di ossidazione degli xenobiotici

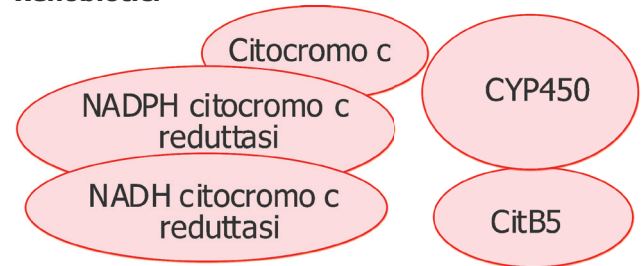


Figura 10
Ciclo delle ossidasi a funzione mista (MFO) o monossigenasi o CYP450

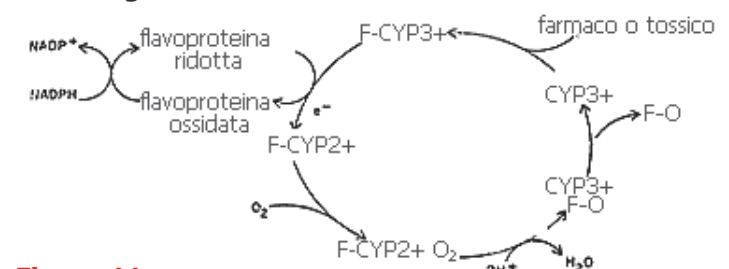


Figura 11
Meccanismo di induzione delle monossigenasi

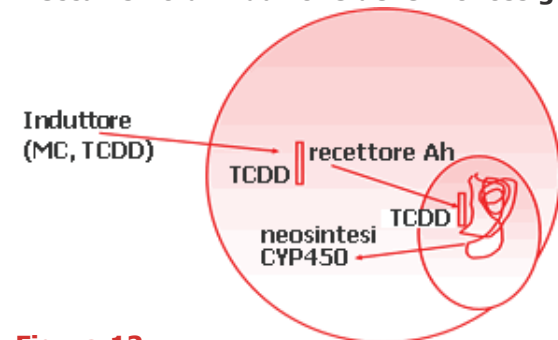


Figura 12
Induzione della attività del P450 (attività aril idrocarbon idrossilasi, AHH) nel fegato di ratti trattati con metilcolantrene (MC) o tetraclorodibenzodiossina (TCDD)

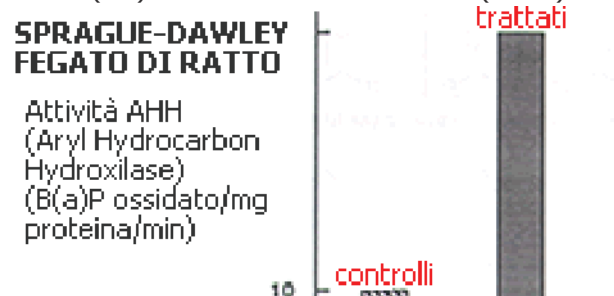


Figura 13

Polimorfismi del CYP1A1:

- individui con l'allele m1 (MspI) hanno attività AHH aumentata
- il polimorfismo m2 (Ile/Val sull'esone 7), provoca aumento dell'inducibilità e dell'attività AHH
- la presenza di polimorfismo m1 è associata ad un maggiore rischio di cancro del polmone in alcune popolazioni (giapponesi, hawaiani, caucasici) (*Song et al., Carcinogenesis 22, 11-16, 2001*)

I PAH (idrocarburi policiclici aromatici) come il benzo(a)pirene, (B(a)P), vengono ossidati a epossidodioli elettrofili (**figura 14**) che formano "addotti" (cioè derivati covalenti stabili) con RNA, proteine e con alcune basi del DNA (**figura 15**), causa quest'ultima di errori del codice genetico e quindi di mutazioni (**figura 16**).

Un altro esempio simile è quello dell'aflatossina B1, che in forma di derivato diolo-eossido, può formare addotti a proteine, RNA e DNA. Mentre gli addotti alle proteine ed all'RNA provocano alterazioni della funzione cellulare e quindi tossicità dose-dipendente, gli addotti al DNA causano mutazioni; le dosi comprese tra 10^{-9} e 10^{-8} mole/kg di peso corporeo (nel caso della aflatossina B1) sono responsabili dell'induzione di tumori epatici (epatomi) nel ratto (**figura 17**).

Figura 14
Metabolismo del benzo(a)pirene (B(a)P)

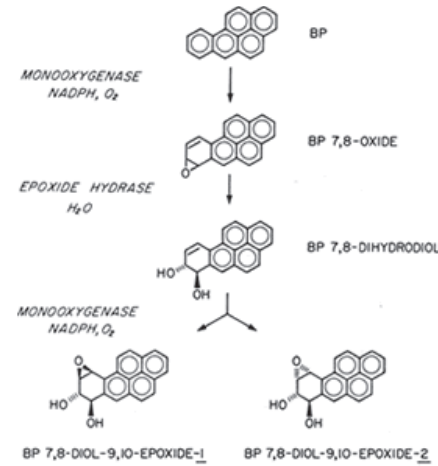
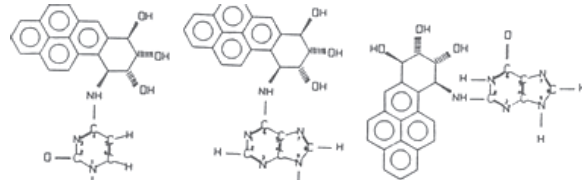
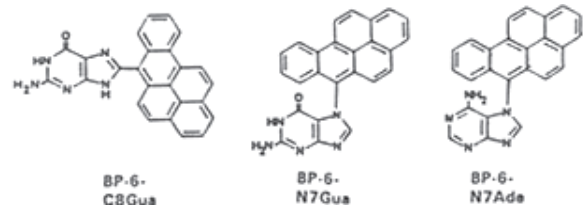


Figura 15
Addotti dei PAH con le basi del DNA



Addotti del benzo(b)pirene con le basi puriniche e pirimidiniche attraverso la formazione di un eossido



Microsomi: 12% 10% 58% Pelle di topo: 34% 10% 30%
Addotti del benzo(a)pirene con le basi puriniche e pirimidiniche attraverso la formazione di un catione radicalico

Figura 16
Formazione di addotti voluminosi del B(a)P diolo-eossido con il DNA e induzione di mutazioni e di cancro

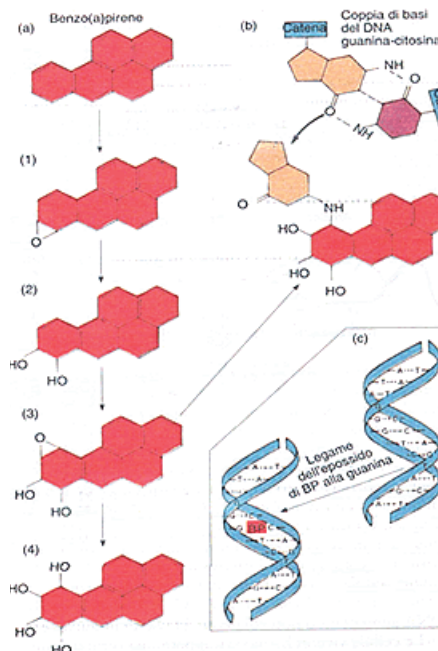
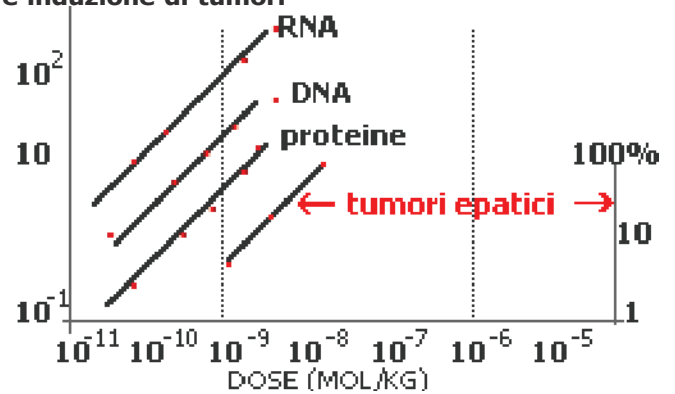


Figura 17

Binding dell'aflatossina B1 a RNA- DNA-proteina e induzione di tumori



Da Neumann et al., *Monitoring Human Exposure to Carcinogenic and Mutagenic agents*, IARC, Lione 1984, pag. 117, modificato

La misura degli addotti al DNA è molto importante in tossicologia, e può essere fatta con metodi di spettrometria di massa, con isotopi, con metodi immunologici o con il cosiddetto metodo del ^{32}P (figura 18). Con questo metodo si lega il ^{32}P radioattivo al DNA idrolizzato (figura 19), che viene in seguito fatto migrare con un metodo di cromatografia multidimensionale (figura 20). Utilizzando delle lastre fotografiche, le macchie radioattive del cromatogramma possono essere evidenziate. Se si formano macchie addizionali rispetto a quelle dovute al legame del fosforo radioattivo con le quattro basi canoniche del DNA, queste macchie addizionali sono legate alla presenza di "addotti" di un mutageno-cancerogeno che hanno variato le proprietà cromatografiche; in questo modo le macchie addizionali, che rappresentano ciascuna un tipo di addotto chimico diverso, possono essere identificate e quantificate (figura 21).

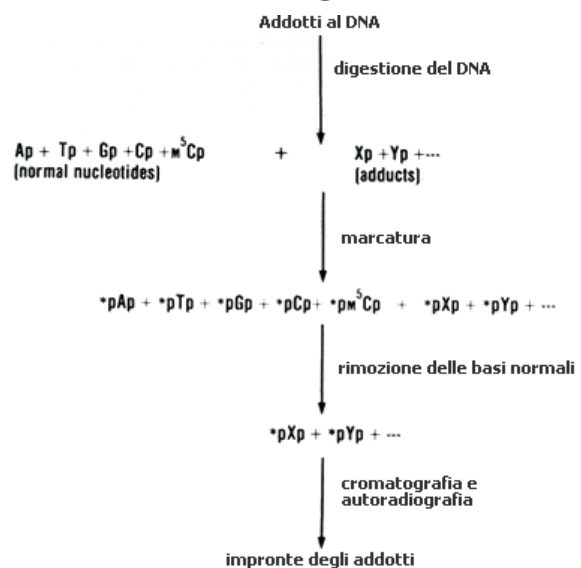
Figura 18

Metodi di misura degli addotti

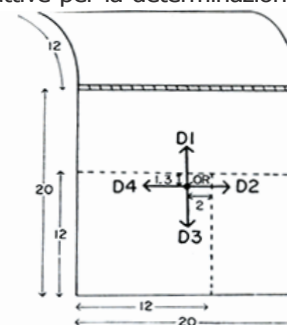
- uso di traccianti radioattivi
- spettrometria di massa (misurazione diretta dell'addotto)
- metodi immunologici
- metodo del ^{32}P

Figura 19

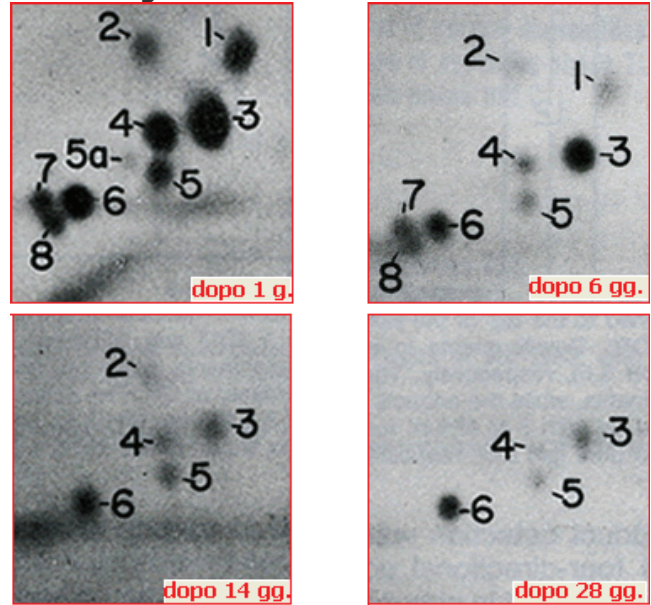
Idrolisi e marcatura degli addotti

**Figura 20**

Cromatografia quadrimensionale per la separazione delle macchie radioattive per la determinazione di addotti con ^{32}P



Lastra per la determinazione di addotti con ^{32}P dalla cute dopo applicazione di dimetilbenzantracene. D1-D4 sono le direzioni di migrazione del solvente. Gli altri numeri rappresentano le distanze della migrazione rispetto all'origine

Figura 21**Autoradiografia di addotti con il ^{32}P** 

1-4 = A,G,T,C; 5 = ^{32}P ; 6-8 = addotti. L'isolamento degli addotti è stato fatto a tempi diversi dal trattamento (da 1 a 28 gg)

Figura 22**Effetti funzionali degli addotti al DNA**

Errori del codice genetico nelle cellule somatiche:

- a. riparazione accurata: scarso o basso danno
 - b. riparazione non accurata: mutazioni, cancro
- Cellule germinali: sterilità o malformazioni

Questi addotti possono essere riparati dalla cellula e quindi non avere effetti tossicologici. Se questo riparo è imperfetto, per carenza dei sistemi di riparo o per un eccesso di lesioni dovuto all'alta dose del mutageno-cancerogeno, si hanno nella cellula danni genetici. Se ciò avviene nella cellula somatica si verificheranno processi di invecchiamento, morte cellulare programmata (apoptosi) o, in alcuni casi, nascita di cloni cellulari tumorali. Se ciò avviene nella linea germinale si potrà avere sterilità o malformazioni (se i gameti parzialmente danneggiati danno luogo ad un nuovo organismo) **(figura 22)**.

rox

lezione n. 4

Prove di tossicità

Le prove di tossicità sono esperimenti su animali di laboratorio mediante i quali si studiano le proprietà tossiche di una sostanza. Queste prove vengono condotte secondo protocolli che hanno alcune variazioni, ma che obbediscono ad alcuni criteri generali, delineati diversi decenni fa come risposta a gravi incidenti nell'uso dei farmaci non preceduto da una sufficiente informazione tossicologica su altri mammiferi (**figura 1**).

Nelle prove di tossicità acuta la sostanza viene somministrata in dose unica. Nonostante che per definizione la somministrazione delle sostanze da saggiare debba avvenire in una seduta unica, l'osservazione degli animali dopo la somministrazione della sostanza deve essere prolungata per un periodo di 14 giorni al fine di non trascurare effetti tossici che si manifestano con una certa latenza, pur sempre classificabili come effetti acuti. Comunemente le prove di tossicità acuta vengono effettuate su individui di entrambi i sessi in almeno due specie di mammiferi, per almeno due vie di somministrazione, che rappresentano le probabili vie di esposizione umana alla sostanza (**figura 2**). Esistono alcune differenze tra le regole della EU sulle prove di tossicità acuta rispetto a quelle operanti negli USA (**figura 3**).

La misura principale della tossicità acuta è la dose letale, comunemente misurata come DL50 o dose letale 50. La DL50 è la dose che statisticamente produce la morte del cinquanta per cento degli animali per una determinata via di somministrazione. Tale via

Figura 1

Origini storiche delle prove di tossicità

- 1930 (USA): reazioni tossiche oculari gravi dopo l'uso di p-fenilendiammina come cosmetico
- 1937 (USA): 107 morti per somministrazione di sulfamidici in glicole etilenico
- 1938 (USA): nascita della FDA (Food and Drug Administration)
- La talidomide (anni '60, Europa) provoca quasi 10000 focomelici

Figura 2

Tossicità acuta

EU	USA
2 specie di roditori	ratti
M e F adulti	M e F adulti
dosi > 3	adeguato
n = 10	n > 3
controlli = veicolo	controlli = veicolo
digiuno	digiuno
gavaggio	gavaggio (< 1 ml/100 g)

Figura 3

EU	USA
osservazione: 14 d	osservazione: 14 d
controllo peso (1-7-14 d)	controllo peso (1-7-14 d)
controllo tossicità (ogni 24 h)	controllo tossicità (ogni 24 h)
n = 10	n > 3
necropsia (con istologia, se dubbia)	CL (Confidence Limits) della DL 50 < 20%

viene di solito indicata in parentesi (o in sottoscritto) alla DL50 (ad es. inh. = inalatoria; s.c. = sottocute; i.p. = intraperitoneo; os: orale; tc = transcutanea). La DL50 è utilizzata per gli scopi discussi in **figura 4**.

Gli esperimenti di tossicità acuta sono analizzati con procedure standardizzate da decenni e descritte in tutti i libri di statistica e tossicologia sistematica, a cui rimandiamo per una trattazione analitica. Richiameremo qui alcuni concetti di base utilizzati nell'analisi delle funzioni di mortalità con il metodo dei Probit (**figura 5**). L'assunzione sulla quale sono basati questi calcoli statistici è quella di normalità. Si assume cioè che la variabile morte sia distribuita in funzione della dose, seguendo una distribuzione gaussiana. Esisteranno cioè per ogni sostanza somministrata a dosi tossiche, alcuni individui (i più numerosi) che risponderanno ad una dose μ , altri, meno frequenti rispetto alla classe con sensibilità μ , disposti sulla sinistra della media (più sensibili, cioè che muoiono a dosi inferiori) ed altri resistenti, in numero simmetrico rispetto ai sensibili (cioè che muoiono a dosi superiori). Questo purché la distribuzione statistica per quella determinata sostanza segua una distribuzione normale e ci sia una sola popolazione dal punto di vista della sensibilità alla sostanza da saggiare. Per facilità di calcolo la distribuzione viene linearizzata utilizzando al posto della ordinata P (che misura la probabilità dell'evento atteso (morte) all'interno della popolazione sperimentale) una funzione y, detta Probit (da Probability Unit) nella quale la probabilità y è calcolata in funzione degli scarti delle x dalla media μ

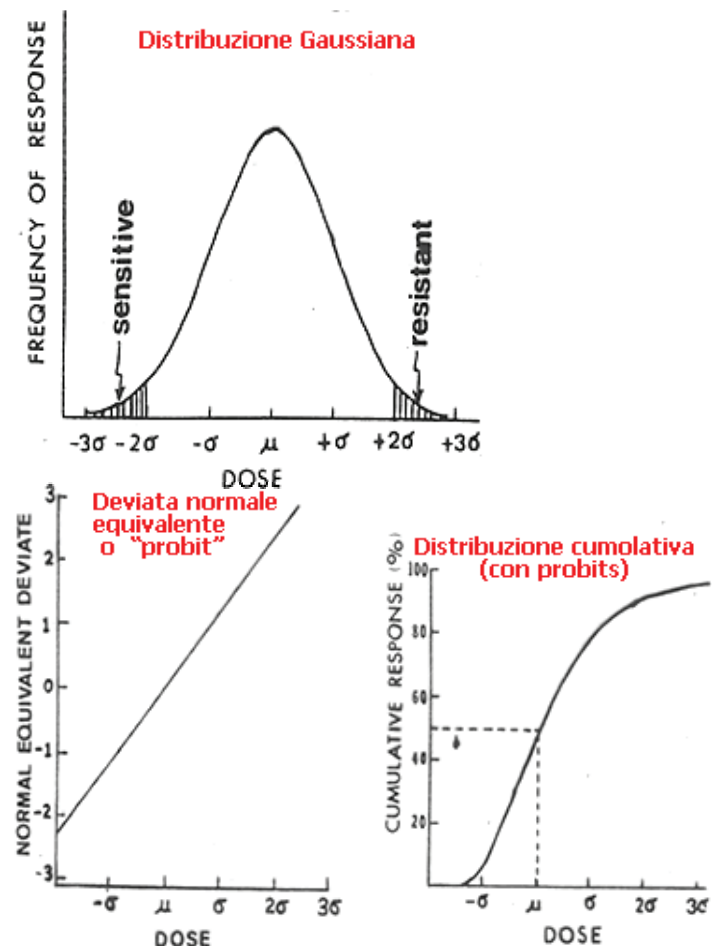
Figura 4

Usi della dose letale 50

- per standardizzare la potenza di un farmaco
- per calcolare l'indice terapeutico (DL50/DE50)
- per selezionare le dosi per gli studi di tossicità cronica
- per ottenere informazioni sulla biodisponibilità
- per prevedere le sintomatologie tossiche

Figura 5

Linearizzazione di una curva dose-effetto mediante i PROBIT (probability units)



normalizzati sulla deviazione standard (sigma): $y = (x - \mu)/\sigma$. Trasformando i valori di risposta cumulativa P in probit (le percentuali di morti osservate ad ogni livello di dose), si avrà una funzione lineare. Infatti, la trasformazione in probit porta gli effetti a dosi alte e basse verso la linearità. Trasformati in probit i valori di % di mortalità la DL50 è quella dose che corrisponde ad un probit di 5 (cioè ad una mortalità del 50%)

(figura 6).

Le caratteristiche fondamentali che spiegano la popolarità degli animali da esperimento nella pratica scientifica sono la bassa variabilità individuale, la possibilità di condurre sperimentazioni in tempi brevi (ad esempio un esperimento di tossicità cronica "a vita" dura nei roditori un massimo di due anni), la possibilità di controllare integralmente le variabili ambientali (condizioni di stabulazione ben definite, temperatura, luce, alimentazione, esercizio fisico).

Utilizzando la DL50, le sostanze possono essere definite "poco tossiche" ($DL_{50} > 200$ mg/kg di peso corporeo), "tossiche" ($DL_{50} = 25-200$ mg/kg), "molto tossiche" ($DL_{50} = 5-25$ mg/kg) ed "estremamente tossiche" ($DL_{50} < 5$ mg/kg).

La figura 7 riporta esempi di sostanze poco tossiche e la figura 8 di sostanze estremamente tossiche. Come esempio di sostanza estremamente tossica illustreremo la tetrodotossina, presente nel fugu, o pesce palla (figura 9), che provoca numerose intossicazioni in Giappone (figura 10) ed è un bloccante selettivo canali al sodio (figura 11), meccanismo che spiega i sintomi dell'avvelenamento (figura 12).

Figura 6
Analisi di un esperimento di mortalità con i Probits

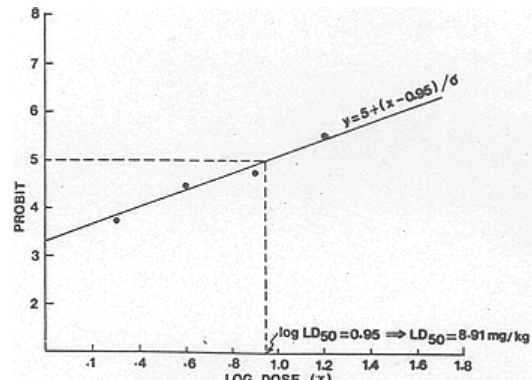


Figura 7

Valori approssimativi di DL50 per sostanze poco tossiche

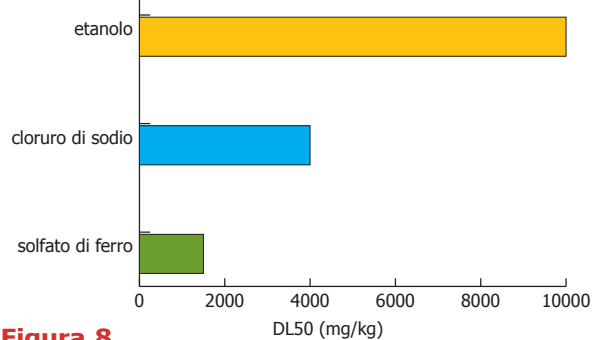


Figura 8

Valori approssimativi di DL50 per sostanze estremamente tossiche

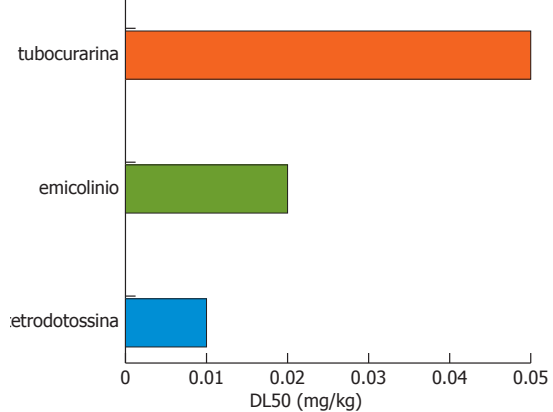


Figura 9

Pesce palla (fugu)

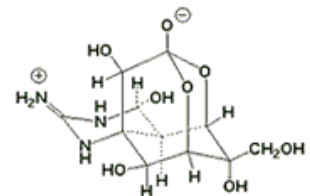


Figura 10

Tetrodotossina:

- 200 intossicazioni l'anno nel solo Giappone (50% di letalità)
- probabilmente assunta dal fugu per ingestione di stelle di mare
- presente nel fegato, intestino, gonadi, pelle del fugu

Altra sostanza estremamente tossica è la tossina botulinica. La tossina botulinica può essere presente in alcuni cibi conservati senza appropriata sterilizzazione (figura 13) e inattiva le fibre colinergiche (figura 14). La tossina botulinica ha trovato a basse dosi alcune indicazioni d'uso interessanti (figura 15).

La DL50 è fortemente influenzata dalla specie (figura 16) e dalla temperatura (figura 17), essendo massima a 26°C e riducendosi a temperature superiori ed inferiori. Lo stress termico aumenta in altre parole la sensibilità alle sostanze tossiche. Questo vale ovviamente anche per gli esseri umani (pensiamo alla morte da ipotermia in corso di intossicazione da alcol in climi freddi).

Figura 11

Meccanismo di azione della tetrodossina: blocco selettivo dei canali del sodio

Figura 12

Sintomi di avvelenamento

- parestesie alla lingua
- vomito, diarrea
- paralisi senza perdita di coscienza
- aritmie e morte

Figura 13

La **tossina botulinica** (dal lat. botulus, salsiccia)

- circa 100 casi di intossicazione/anno solo in USA
- cibi inscatolati o conservati impropriamente contenenti *Clostridium botulinum*
- paralisi del sistema colinergico per blocco della liberazione di acetilcolina

Figura 14

Meccanismo della tossina botulinica

	arriva lo stimolo nervoso
	la vescicola colinergica integra libera acetilcolina
	acetilcolina
	l'acetilcolina si lega al recettore
	effetto
	l'acetilcolinesterasi idrolizza l'acetilcolina
	la tossina botulinica entra nel neurone
	la vescicola colinergica è inattivata dalla tossina

Figura 15

Usi vari della tossina botulinica (basse dosi!)

- inattivazione delle fibre colinergiche per iperidrosi o distonie muscolari
- usi estetici, per l'appianamento delle rughe

Figura 16

DL50 in specie diverse

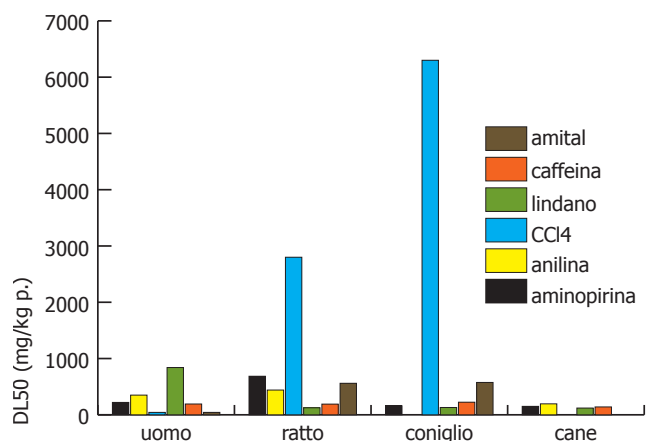
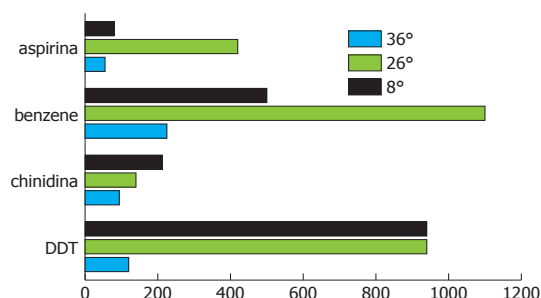
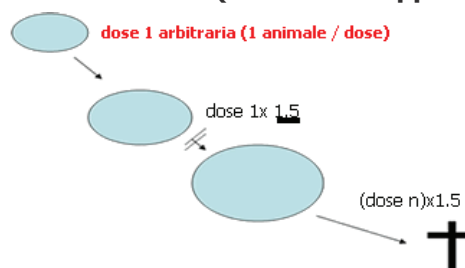
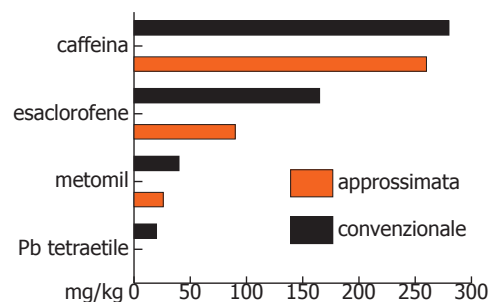
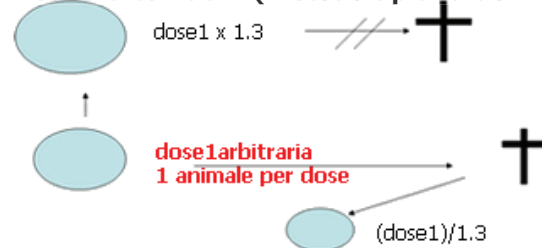


Figura 17**DL50 a temperature diverse****Figura 18****Metodi alternativi (dose letale approssimata)****Figura 19****Relazione tra la DL50 convenzionale e DL50 approssimata****Figura 20****Razionale dei metodi alternativi di determinazione della DL50:**

- la DL50 dà solo misure imprecise
- è preferibile usare un metodo impreciso se ciò permette di utilizzare meno animali

Figura 21**Metodi alternativi (metodo up and down)****Figura 22****Metodo della British Society of Toxicology**

Dosi	n
5	5
50	
500 mg/kg	
altre dosi in caso di non effetto delle dosi precedenti	10

Per ridurre l'uso d'animali da esperimento in epoca recente sono state introdotte metodiche alternative. Il primo è quello della "dose letale approssimata", nel quale si aumenta progressivamente la dose e si tratta un solo animale per dose, fino a trovarne una alla quale l'animale muore (figura 18). La dose letale approssimata dà valori assai simili alla DL50 (figura 19). Usare metodi

alternativi è ritenuto accettabile, visto che le misure di DL50 non sono precise (figura 20). Un altro metodo alternativo di dose letale è quello dell'"up and down" (figura 21), nel quale si parte da una dose arbitraria

e se questa porta alla morte si riduce di un fattore 1/1.3. Se l'animale non muore la dose letale è quella di partenza. Nel caso che l'animale con la dose di partenza non fosse morto, si aumenta la dose di un fattore 1x1.3 in esperimenti successivi finché si raggiunge la dose che uccide l'animale (considerata dose letale). Secondo la British Society of Toxicology (BST), si applicano invece protocolli con dosi fisse, usando piccoli numeri di animali (figura 22).

Quando si renda necessario studiare gli effetti a lungo termine di una sostanza si utilizzano dei protocolli che prevedono la somministrazione per periodi di tempo che rappresentano una quota più importante della vita di un animale da esperimento.

Quando si renda necessario studiare gli effetti a lungo termine di una sostanza si utilizzano dei protocolli che prevedono la somministrazione per periodi di tempo che rappresentano una quota più importante della vita di un animale da esperimento.

Nelle prove di tossicità per somministrazioni ripetute si utilizzano protocolli di durata variabile, che hanno la pretesa di ricostruire sperimentalmente condizioni di esposizione umana. Solo nelle prove di cancerogenesi, tuttavia, il periodo di osservazione può prolungarsi per tutta la vita dell'animale. Nelle prove di tossicità subacuta la comune durata della sperimentazione è di un mese, con somministrazioni giornaliere; gli obiettivi di questi studi sono riassunti nella **figura 23**.

La tossicità subcronica ha una durata di tre mesi, con obiettivi schematizzati nella **figura 24**.

Particolarmente importante è la determinazione della dose massima senza effetti tossici (**no adverse effect level, NOAEL**), della dose più bassa a cui si osservano effetti tossici (**lowest adverse effect level, LOAEL**), che sono alla base del calcolo della dose accettabile giornaliera (**accepted daily intake, ADI**) (**figura 25**). L'ADI è calcolata con dati di tossicologia sperimentale con un cosiddetto "fattore di sicurezza" di 100-1000 a causa delle difficoltà di estrapolazione animale-uomo. Il fattore di sicurezza ideale è incerto, e ci sono interi fascicoli di riviste tecniche che discutono il problema (**figura 26**).

L'organizzazione degli esperimenti di tossicità sperimentale cronica è attentamente codificata. Le dosi sono scelte in modo da evitare la morte degli animali per tossicità acuta **figura 27**. Le osservazioni macroscopiche che si fanno sugli animali sono riassunte nella **figura 28** ed alcuni esami di laboratorio, che assomigliano a quelli usati nello studio delle malattie umane, sono riportati nella **figura 29**.

Figura 23

Obiettivi degli studi di tossicità subacuta

- determinare gli effetti tossici a dosi che consentono la sopravvivenza degli animali
- identificare organi bersaglio
- identificare eventuale tossicità selettiva di specie
- identificare biomarkers di effetto tossico

Figura 24

Obiettivi degli studi di tossicità subcronica

- identificare effetti tossici non evidenti negli studi subacuti
- fornire informazioni per studi cronici
- identificare organi bersaglio
- identificare le specie opportune per studi cronici
- determinazione della NOAEL (dose giornaliera di un composto che assunta a vita non si reputa provocare alcun effetto tossico)

Figura 25

ADI (Acceptable Daily Intake)

$$ADI = \frac{NOAEL}{100 \text{ o } 1000}$$

è la dose giornaliera di un composto che assunta a vita non si reputa provocare alcun effetto tossico

Figura 26

ADI: Un argomento importante



Figura 27

Organizzazione degli studi di tossicità subcronica:

- durata: 3 mesi
- specie: roditori e cani (di solito)
- dimensioni dei gruppi: roditori (10-20) e cani (4-6)
- esposizione: la più simile alla umana (in genere orale)
- la dose più alta deve dare < 10% di mortalità
- la dose più bassa non deve avere effetti tossici acuti
- la dose intermedia viene collocata nel mezzo delle precedenti
- i controlli vengono trattati con il solvente della sostanza studiata

Figura 28

Osservazioni sperimentali negli studi di tossicità subcronica

- peso, consumo di cibo, aspetto e quantità delle feci e delle urine
- aspetto del pelo
- funzione respiratoria
- comportamento
- gli animali malati o sofferenti devono essere sacrificati e sottoposti ad autopsia

La durata degli studi di tossicità negli animali è funzione della durata prevista della esposizione umana: se breve (< 30 gg), la durata è di tre mesi, se media (1-6 mesi), la durata è di 6 mesi, se medio lunga (> 6 mesi), di sei mesi-un anno. Gli studi di tossicità per somministrazioni ripetute vengono effettuati comunemente su due specie di mammiferi di cui almeno una non roditore, per vie di somministrazione che tengono conto di quelle previste per l'uso medico o per la esposizione umana professionale o accidentale. Le specie devono essere scelte cercando, per quanto possibile, di scegliere specie con risposte farmaco-tossicologiche simili a quelle umane.

Le leggi che controllano la sicurezza dei composti chimici, sono la TOSCA (Toxic Substance Control Act, 1977) in USA e il "VI Emendamento" nell'Unione Europea (1981) (http://ec.europa.eu/environment/dansub/home_en.htm). Le due leggi si sono influenzate tra loro, ma hanno differenze sul tipo di sanzioni (**figura 30**) e sulla specificazione dei controlli (**figura 31**).

Le leggi dell'Unione Europea prevedono trattamenti diversi per le sostanze nuove e per quelle da tempo in produzione e sulla base della produzione annua. Nel caso di produzione minore di 10 tonnellate l'anno, le richieste di certificazione tossicologica sono minori (**figura 32**), che nel caso di sostanze ad alta (**figura 33**) o altissima produzione (**figura 34**).

Figura 29

Osservazioni sperimentali correnti negli studi di tossicità subcronica e cronica

- ematocrito, emoglobina, emocromo
- tempo di protrombina
- esame delle urine (pH, sedimento, gravità specifica, ecc.)

Figura 30

Differenze tra TOSCA e VI emendamento EU

TOSCA	VI emendamento
si applica a tutte le sostanze	si applica alle nuove sostanze
specifiche sanzioni	non sono specificate sanzioni
controllato dalla EPA (Environmental Protection Agency)	controllato dagli Stati Membri
le nuove sostanze devono essere registrate 90 d prima della commercializzazione	registrazione prima di 45 d

Figura 31

TOSCA	VI emendamento
non specifica il tipo di controlli di tossicità	specifica il tipo di controllo sulla base del volume di produzione
la etichettatura è proposta dalla EPA caso per caso	si precisano norme generali per l'etichettatura

Figura 32

EU, livello 0: produzione 1-10 T/anno

- specificazione di tossicità: tossicità acuta, orale, dermica, subcronica, mutagenicità
- specificazione di ecotossicità: tossicità per i pesci, dafnia, BOD, COD, biodegradabilità, degradazione chimica

Figura 33

EU, livello 1: produzione 10-100 T/anno

- specificazione di tossicità: studi di teratologia, tossicità, studi di fertilità, mutagenesi e cancerogenesi
- specificazione di ecotossicità: tossicità cronica per i pesci e gli uccelli, inibizione algale, tossicità per i lombrichi, accumolo, degradazione, assorbimento e desorbimento

Figura 34

EU, livello 1: produzione > 100 T/anno

- specificazione di tossicità: tossicità cronica in non roditori e tossicocinetica, cancerogenesi e teratologia (non roditori)
- specificazione di ecotossicità: tossicità cronica per i pesci e gli uccelli, inibizione algale, tossicità per i lombrichi, accumolo, degradazione, assorbimento e desorbimento

Le prove di tossicità previste dalla EU sono in genere molto severe, e includono parametri per la valutazione della ecotossicità. Per esempio, includono studi sui lombrichi (**figura 35**), che hanno una sensibilità alle sostanze tossiche diversa dai mammiferi (**figura 36**).

Le leggi europee si applicano solo alle nuove sostanze chimiche ed a quelle in commercio che presentino dei profili di tossicità ancora incerti.

Nella comunità europea la tossicità delle sostanze chimiche di interesse industriale "dovrebbe" essere controllata da comitati di esperti di tutti i paesi aderenti. Nonostante le buone intenzioni il compito è gravoso per il gran numero di sostanze da esaminare (**figura 37**), il che ha portato ad un numero estremamente basso di dossier tossicologici conclusi (**figura 38**). La situazione non è migliore negli USA (**figura 39**).

Figura 35

Tossicità per i lombrichi

- seminare nel terreno *Eisena foetida*
- mescolare dosi della sostanza fino ad ottenere una concentrazione omogenea
- incubare per 14 d a 20°C
- contare i lombrichi vivi (chi non si muove è morto)
- determinare la DL50

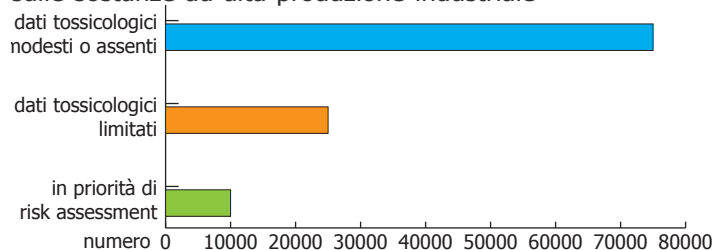
Figura 36

Tossicità di sostanze chimiche per i lombrichi e per i topi

sostanza	<i>Eisena foetida</i> (CL50) mg/kg	topo (DL50) mg/kg
2,4-dinitrofenolo	0.6	45
carbaryl	14	438
benzene	75	4700
1,1,1-tricloroetano	83	11240
dimetilftalato	550	7200

Figura 37

EU, 2001: situazione della documentazione tossicologica sulle sostanze ad alta produzione industriale



Rielaborato da dati della European Environmental Agency <http://www.environmentaldefense.org/>

Figura 38

EU 2001: sostanze ad alta produzione industriale e loro valutazione

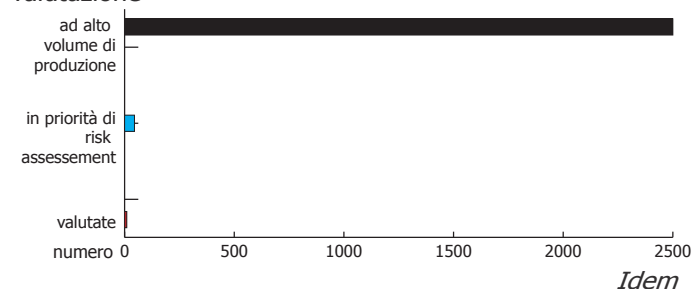
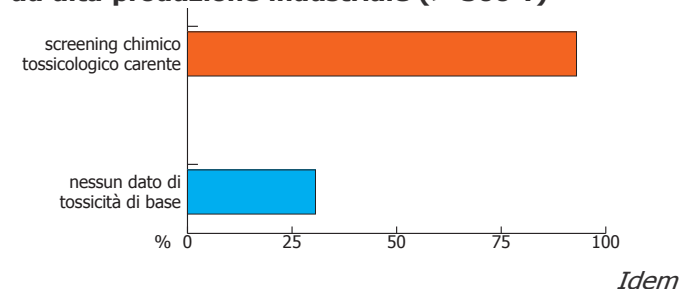


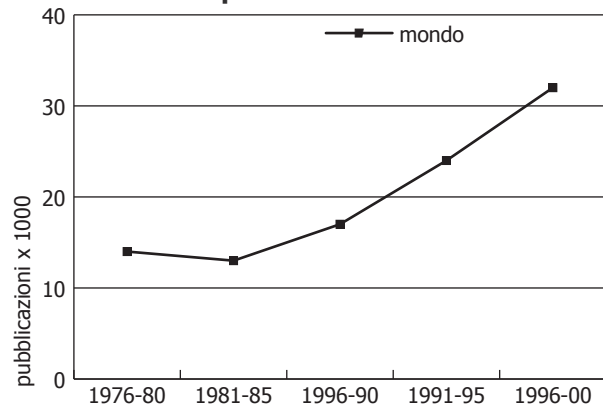
Figura 39

USA: documentazione tossicologica su sostanze ad alta produzione industriale (> 500 T)



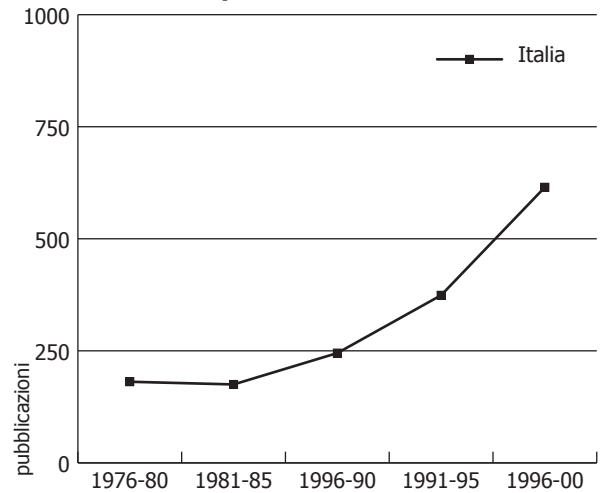
Recentemente a livello europeo è stata proposta una sorta di autocertificazione delle aziende che si impegnano a controllare la tossicità dei loro prodotti. Il programma, in vigore dal 2006, si chiama REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals) Nonostante la lentezza dei governi a intervenire con controlli sull'industria, le banche dati scientifiche internazionali, come la Medline dimostrano che sempre più ricercatori nel mondo (**figura 40**), se non in Italia (**figura 41**), studiano l'effetto tossico e ambientale delle sostanze chimiche.

Figura 40
Variazioni delle pubblicazioni nel mondo su "environmental pollution"



Rielaborato da dati della Medline
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>

Figura 41
Variazioni delle pubblicazioni in Italia su "environmental pollution"



rox

lezione n. 5

Tossicologia genetica

La tossicologia genetica è quella specializzazione della tossicologia che si occupa dell'effetto di trattamenti chimici e fisici sulla struttura e funzione del patrimonio ereditario cellulare. Le sostanze o i trattamenti che provano alterazioni del patrimonio genetico sono definiti "agenti mutageni" o "mutageni" perché sono capaci di indurre mutazioni. Le mutazioni vengono corrette dai sistemi di riparo, con l'attivazione di endonucleasi e la rimozione delle sezioni di DNA alterato e delle zone circostanti (nelle cellule di mammifero circa 30 basi sono rimosse per ogni singola lesione).

La frequenza di mutazioni non è la stessa nei diversi tipi di cellule. Per quanto riguarda le cellule umane, la frequenza di rotture del DNA a singolo filamento del DNA è di circa 1000 per ora per cellula (**figura 1**). Queste rotture sono anche definite SSB con la terminologia inglese (single strand breaks). Contribuiscono alla formazione di rotture a singolo filamento anche le lesioni ossidative del DNA, che hanno una frequenza intorno a 100/200 per ora per cellula. La frequenza di rotture a singolo filamento in cellule che non siano esposte a sostanze mutagene è relativamente bassa e si stima dell'ordine circa una lesione ogni milione di basi.

Da un punto di vista funzionale sono più importanti le cosiddette rotture a doppio filamento. Secondo la terminologia inglese queste rotture si chiamano DSB (double strand breaks). La frequenza di rotture a doppio filamento è più bassa di circa dieci volte, e

Figura 1

Numero di SSB (single strand breaks: rotture a singolo filamento)/cellula/h:

- 1000 (1×10^{-6} basi)
- lesioni ossidative 100-200/($0.1-1 \times 10^{-6}$ basi)

Vilenchik and Knudson, PNAS 100, 12871-12876, 2003

si colloca intorno al valore di 1×10^{-7} . Si calcola che ci siano circa 50 DSBs per ogni ciclo cellulare (**figura 2**).

Da varie evidenze sperimentali abbiamo risulta chiaro che la maggior parte delle rotture a singolo filamento tendono ad essere riparate e quindi non hanno gravi effetti funzionali, mentre maggiore è l'esito funzionale delle DSBs.

Per mutazione si intende un cambiamento stabile del materiale genetico dell'individuo, cioè del suo DNA, che può essere trasmesso alla discendenza (cellula o prole). Gli eventi mutazionali sono relativamente rari e casuali, ma diventano frequenti quando l'ambiente è inquinato da sostanze chimiche o agenti fisici capaci di indurre mutazioni. L'individuo che è portatore di mutazioni si definisce "mutante" (**figura 3**). Tutte le popolazioni hanno individui mutanti, in alcuni casi facilmente riconoscibili come gli albi (soggetti con mutazione di un gene che controlla la sintesi della melanina, che quindi facilmente si riconoscono perché privi di pigmenti sia sulla cute sia sulle iridi; gli albi hanno occhi apparentemente rossi, perché trasparente dalla cornea il colore dei vasi dell'iride e della retina (**figura 4**). Molti altri mutanti sono più difficili da riconoscere macroscopicamente e richiedono l'uso di metodiche di biologia molecolare.

I mutanti sono presenti in tutte le specie animali e vegetali. Mutazioni delle specie vegetali sono da sempre utilizzate in agricoltura per selezionare varietà con proprietà desiderabili (**figura 5**).

Figura 2
DSBs (double strand breaks: rotture a doppio filamento):

- 50/ciclo cellulare
- 0.05×10^{-6} basi

Vilenchik and Knudson, PNAS, 100, 12871-12876, 2003

Figura 3
Mutanti: individui mutanti si riscontrano in natura nelle popolazioni umane



Indiano albino: portatore di una mutazione sui geni che codificano la sintesi di melanina

Figura 4
Mutanti: si riscontrano in tutti gli esseri viventi



Pinguino albino: assenza di melanina nelle penne e negli occhi (occhi rossi)

Tuttavia la probabilità che una mutazione si traduca in un effetto benefico per un organismo è bassa e, come diceva un famoso ecologo del XX secolo, Barry Commoner, è probabile che una mutazione migliori un organismo che un ago inserito a caso in un orologio lo faccia funzionare meglio.

Molti pensano che eventi fondamentali della storia dell'uomo (come lo sviluppo di un cervello evoluto con grande rappresentazione della corteccia cerebrale) siano avvenuti a causa di una mutazione che ha provocato un maggiore sviluppo delle cellule della materia grigia; si pensa anche che sia dovuto a mutazione lo sviluppo di una laringe che consente una fonazione articolata, assente in tutti i mammiferi a noi vicini. Si pensa anzi che sia lo sviluppo della laringe che ha permesso lo sviluppo di società organizzate nella quale la trasmissione orale della conoscenza ha un ruolo fondamentale.

La **figura 6** riassume le lesioni genetiche umane più frequenti. Molto conosciuta è la trisomia del ventunesimo cromosoma, o sindrome di Down. Esistono numerose malattie umane nelle quali alterazioni di importanti proteine sono legate a mutazioni geniche. Un aspetto particolare delle mutazioni è legato alla loro capacità di provocare tumori, fenomeno sul quale ci soffermeremo nel capitolo sulla cancerogenesi. In linea generale, l'alterazione di una o una sequenza di basi del DNA si traduce in una alterazione funzionale delle proteine codificate ovvero in una modifica o perdita della loro funzione (**figura 7**).

Figura 5

Agricoltori e allevatori hanno sfruttato la presenza di mutazioni in natura: alcuni fenotipi del pomodoro presenti in natura, selezionati per le loro proprietà



Figura 6

tipo di alterazione genica	frequenza/10 ³ nati	esempio
alterazione nel numero dei cromosomi	5	sindrome di Down
mutazioni geniche	circa 1-2	emofilia
		anemia falciforme
		albinismo
		fenilchetonuria
		fibrosi cistica
		retinoblastoma*
		poliposi familiare del colon*

* tumore ereditario

Figura 7

Un gene determina la struttura primaria di una proteina specifica

- ↪ sequenza delle basi del DNA
- ↪ sequenza delle basi dell'RNA
- ↪ sequenza degli aminoacidi sulle proteine
- ↪ funzione

L'accoppiamento delle basi del DNA è una delle regole più ferme della biologia. Infatti, in tutte le cellule viventi la citosina si accoppia con la guanina e la timina con l'adenina (**figura 8**). Molte mutazioni sono dovute ad una alterazione dell'accoppiamento delle basi, legato a modificazioni delle basi stesse. Tuttavia alcune alterazioni avvengono a livello dei cromosomi. Molte di queste alterazioni si evidenziano infatti con lo studio morfologico del cariotipo, cioè del numero e della morfologia dei cromosomi (**figura 9**).

Le cellule degli organismi multicellulari, tra i quali i mammiferi e l'uomo, possono essere distinte in cellule somatiche e cellule germinali (**figura 10**). Gli effetti di una mutazione su cellule germinali o somatiche sono profondamente diversi (**figura 11**).

Dal punto di vista del meccanismo di mutazione, possiamo distinguere mutazioni cromosomiche, mutazioni genomiche e mutazioni geniche.

Le mutazioni cromosomiche (**figura 12**) sono dovute a meccanismi diversi, come la perdita di un intero cromosoma o la sua duplicazione, la perdita di una frazione di un cromosoma, o dalle traslocazioni (un pezzo del cromosoma va a finire su un cromosoma diverso). Gli effetti di queste alterazioni sono quasi sempre importanti. Infatti si hanno in questo modo delle grosse perdite di informazione, oppure delle variazioni della regolazione genica per effetto di posizione, che interessa famiglie intere di geni.

Figura 8

Appaiamento delle basi del DNA



Figura 9

Cariotipo di un maschio umano normale

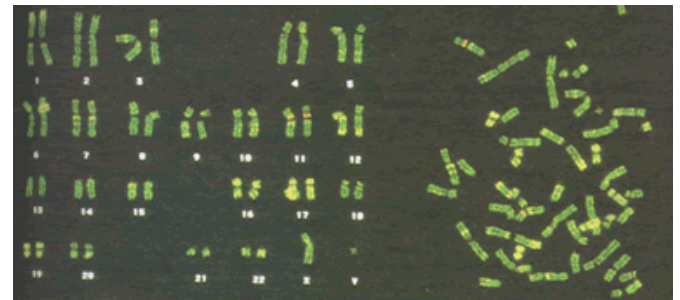


Figura 10

Tipi di cellule in organismi pluricellulari (uomo)

cellule somatiche:

- assetto cromosomico diploide ($2n$)
- nell'uomo $n = 23$, $2n = 46$

cellule germinali o sessuali (gameti):

- spermatozoi e cell. uovo
- assetto cromosomico aploide (n)
- un solo cromosoma per ogni coppia

Figura 11

Effetto delle mutazioni

cellule somatiche:

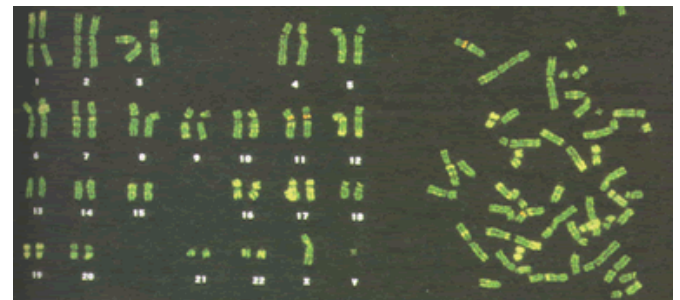
- sterilità
- malattie genetiche

cellule germinali o sessuali (gameti):

- cancro ereditario
- invecchiamento
- teratogenesi

Figura 12

Mutazioni cromosomiche (1): alterazioni nella struttura dei cromosomi



Alterazioni cromosomiche importanti si osservano nelle cellule di numerosi tumori, e sono spesso responsabili del loro comportamento biologicamente incontrollato (figura 13). Succede che la struttura dei cromosomi sia mantenuta, ma che sia alterato il loro numero.

Figura 13

Mutazioni cromosomiche: delezioni trovate in tipi differenti di tumori umani. Le bande colorate rappresentano punti di rottura ricorrenti

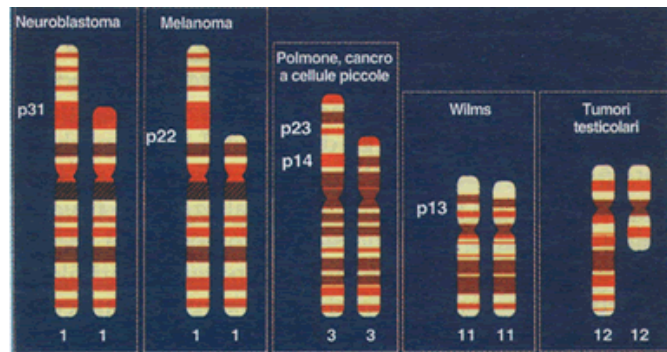
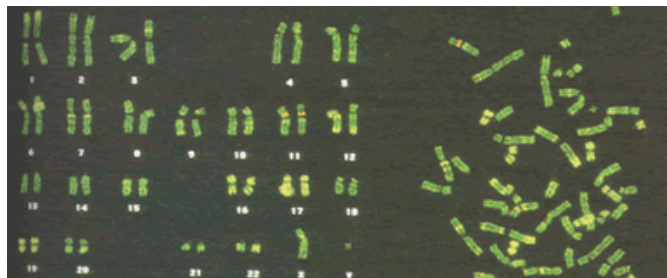


Figura 14

Mutazioni genomiche (1): la struttura dei cromosomi rimane uguale ma è **alterato il numero (Aneuploidia, aggiunta o perdita di uno o più cromosomi)**

Questi fenomeni derivano spesso da alterazione dei complicati meccanismi che controllano la migrazione dei cromosomi nel corso della riproduzione cellulare. Questi fenomeni sono anche definiti "aneuploidia" (figura 14).

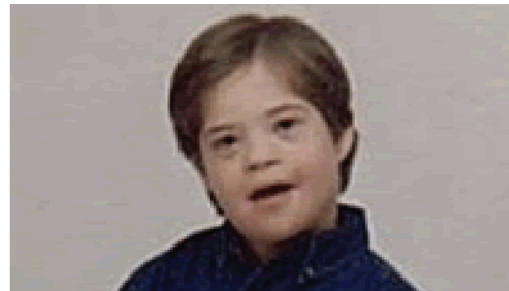


Es. trisomia del cromosoma 21 (1/700)

L'esempio più importante di aneuploidia è la trisomia del cromosoma 21 (figura 15) o morbo di Down.

Figura 15

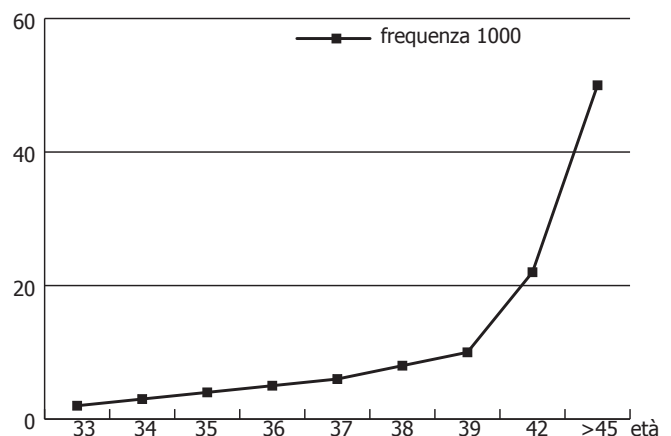
Mutazioni genomiche (1) Trisomia del cromosoma 21 (1/700) (Mongolismo), Morbo di Down (1866)



Purtroppo, come indica la figura 16, questo fenomeno è più frequente quando aumenta l'età della madre, per raggiungere frequenze alte quando la madre ha un'età superiore a trentacinque-quarant'anni (figura 16). Le trisomie del cromosoma 21 sono facilmente diagnosticabili con indagini genetiche prenatali.

Figura 16

Frequenza del morbo di Down in funzione dell'età della madre



Le mutazioni geniche consistono nel cambiamento di una sequenza di basi del DNA. Tre basi codificano sempre per un singolo aminoacido. Tuttavia il DNA è "degenerato" (cioè non univoco per lo stesso aminoacido), non conosce le virgole, e questo comporta errori di lettura quando una base viene aggiunta o eliminata, per scorrimento del codice di lettura (frame shift) e conseguente lettura alterata (missense) (figura 17). Alterazioni della normale sequenza delle basi spesso danno segnali di stop alla sintesi delle proteine. Le proteine più corte che così si formano sono spesso prive di attività. In altri casi, quando si sostituisce una sola base senza variare l'ordine delle basi circostanti, il risultato è la produzione di una proteina con un aminoacido (aa) variato. In certi casi la proteina mantiene la sua funzione, in altri invece la funzione è variata o nulla (figura 18).

Un esempio classico di questo meccanismo è riportato nella figura 19, nella quale si vede come una mutazione singola a carico di una base porta ad alterazione di un aminoacido nella molecola dell'emoglobina (si sostituisce cioè la glutammina alla valina) (figura 20); ciò porta ad una grave malattia, l'anemia falciforme, nella quale l'emoglobina alterata provoca una variazione di forma degli eritrociti (figura 21) che diventano a forma di falce in ambiente ipossico e che vanno incontro più facilmente a rotture, formando degli aggregati all'interno dei vasi che provocano lesioni di organi importanti come il fegato e il rene (figura 22). Questa malattia è molto frequente tra le

Figura 17

DNA originale AAT.TTG.GCC.GCA.ATA
(una tripletta è detta codone)

sostituzione AAT.GTG.GCC.GCA.ATA

inserzione AAT.TTA.GGC.CGC.AAT.A

delezione AAT.TGG.CCG.CAA.TA

Aminoacidi differenti possono alterare la funzione proteica

Figura 18

Gli effetti delle mutazioni geniche dipendono dal punto del genoma in cui avvengono, ovvero dall'aa sostituito e dalla sua funzione nell'ambito della proteina. La mutazione può quindi:

- inattivare il prodotto genico per terminazione prematura della proteina (es. APC*)
- modificare l'eventuale funzione (anemia falciforme)
- non avere effetto (mutazione silente)

*APC: poliposi addenomatosa familiare, legata alla mutazione della proteina APC

Figura 19

Mutazione genica (T ad A) nel gene per l'emoglobina (8% di portatori in Africa)

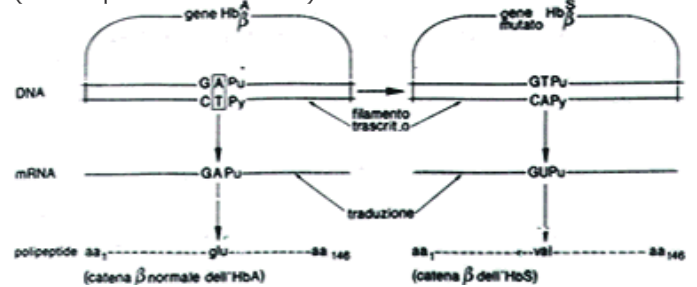


Figura 20

Differenze molecolari tra Hb normale e Hb nell'anemia falciforme

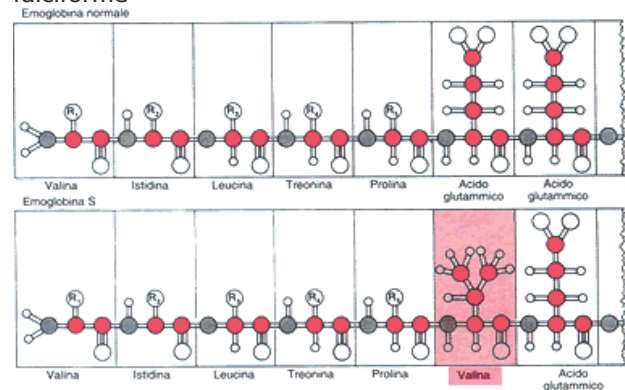
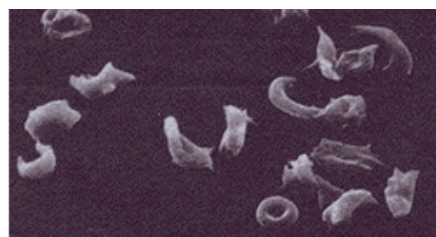


Figura 21

Eritrociti di un soggetto affetto da anemia falciforme



popolazioni africane perché si associa ad una maggiore resistenza alla malaria, ed è quindi divenuta un fattore di selezione, nonostante che sia di per sé una grave malattia. Molte delle sostituzioni aminoacidiche portano solo a varianti con diversa attività di proteine. Ciò fa sì che tutti noi siamo caratterizzati da un estremo "polimorfismo" delle nostre proteine, che sono la base della differente risposta ai farmaci e ai tossici e delle differenze tra individui.

Come abbiamo visto in precedenza le mutazioni spontanee sono relativamente rare. Invece agenti fisici o chimici mutageni possono aumentare considerevolmente la frequenza di mutazioni.

I mutageni fisici sono assai importanti sorgenti di mutazioni. Tra di loro sono presenti in natura costantemente i raggi cosmici, le particelle alfa e beta, le radiazioni gamma (associate ad elementi radioattivi presenti nella crosta terrestre) e le radiazioni UV. C'è una sostanziale omogeneità di effetti tra le radiazioni ultraviolette, i raggi X e i raggi gamma, che differiscono solo per differenze di energia. Le radiazioni ad alta energia provocano sempre alterazioni gravi della struttura del DNA. Non esiste dose di radiazioni senza effetti. Aumentando la dose si ha sempre un aumento lineare del danno al DNA (**figura 23**).

Nella storia recente si sono avuti episodi di esposizione di popolazioni alle radiazioni ionizzanti; tra queste le più importanti sono state causate dall'uso delle bombe atomiche alla fine del secondo conflitto mondiale. La prima, "Little boy" (**figura 24**) fu sganciata dagli americani sulla città giapponese

Figura 22

La precipitazione intravascolare di eritrociti danneggiati provoca microinfarti negli organi parenchimatosi (fegato, rene, ecc.)

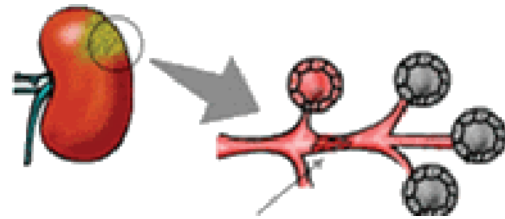


Figura 23

Induzioni di mutazioni da raggi X

Rotture a doppia elica nel DNA

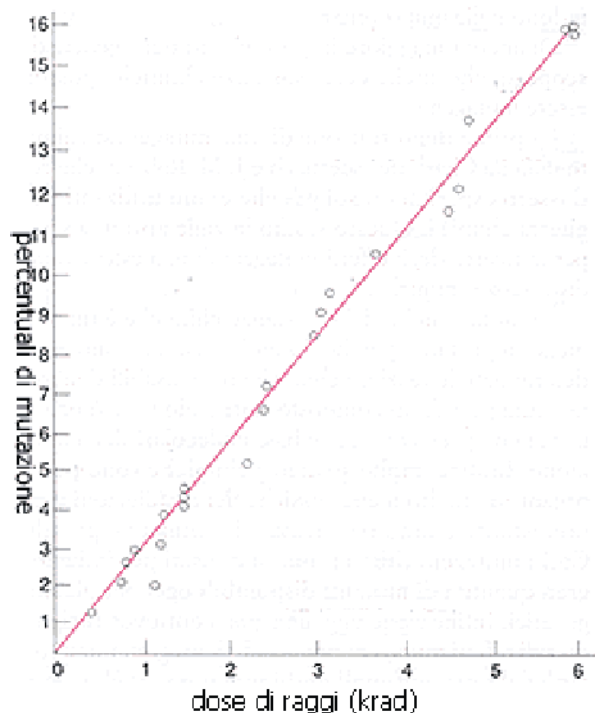
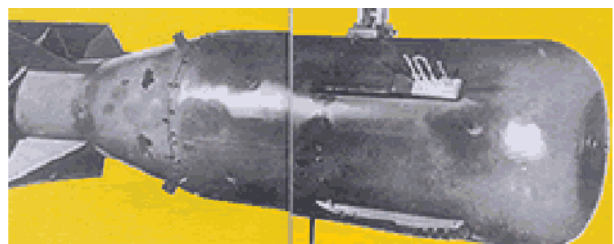


Figura 24

Little boy: la bomba di Hiroshima



Hiroshima (**figura 25**) e fu un effetto collaterale delle scoperte di Enrico Fermi e dei "Ragazzi di via Palinsperna" sulla scissione dell'uranio provocata da neutroni lenti (**figura 26**).

Le bombe atomiche liberano particelle alfa e beta, raggi gamma e neutroni, e producono danni alle cellule e danni genetici (**figura 27**). Gli effetti dell'esposizione alle radiazioni sono ben conosciuti perché la popolazione giapponese vittima delle esplosioni è stata studiata per più di sessant'anni (**figura 28**). Gli abitanti di Hiroshima e Nagasaki sopravvissuti hanno avuto un aumento di circa il 10% dei casi di cancro; l'aumento più significativo è stato a carico dei tumori del sangue e del sistema linfatico (**figura 29**). Importante anche l'aumento del rischio di tumori maligni (K) della mammella, delle vie biliari e dell'ovaio (**figura 30**).

Figura 25

Non era uno scherzo



Figura 26

I padri italiani di little boy



Figura 27

Effetti biologici delle radiazioni ionizzanti

- rottura di legami chimici
- rottura di macromolecole (proteine e DNA)
- **danno genetico**
- ionizzazione chimica, formazione di radicali
- **danno ossidativo**

Figura 28

I sopravvissuti



Figura 29

Rischio di cancro nei sopravvissuti dei bombardamenti atomici di Hiroshima e Nagasaki

siti di tumori	n. di esposti (> 0.01 +) Gy	rischio attribuibile (%)	n. casi di cancro da radiazioni
Tutti i siti	41.719	10.4	357
Leucemia	40.701	56.6	81
Mieloma	40.701	32.9	8
K. Colon	38.859	15.2	20
K. Esofago	39.859	12.8	12

Murhead, Radiat Prot Dosimetry 104, 331-335, 2003

Figura 30**Rischio di cancro nei sopravvissuti dei bombardamenti atomici di Hiroshima e Nagasaki**

siti di tumori	n. di esposti (> 0.01 +) Gy	rischio attribuibile (%)	n. casi di cancro da radiazioni
Polmone	40.382	11.6	25
Stomaco	39.961	6.4	74
Mammella	25.252	22.4	22
Cistifellea	40.06	23.4	20
Ovaio	24.581	18.6	9

Murhead, Radiat Prot Dosimetry 104, 331-335, 2003

Dopo la seconda guerra mondiale gli eventi più importanti associati ad esposizione a materiale radioattivo (**figura 31**) sono avvenuti per la sperimentazione in atmosfera di ordigni nucleari e per incidenti di reattori nucleari, l'ultimo dei quali è avvenuto in Ucraina nel 1986.

Nell'incidente di Chernobyl sono stati liberati in atmosfera numerosi isotopi radioattivi, tra cui il cesio e lo iodio, che hanno contaminato la Russia e parte dell'Europa inclusa l'Italia. Nella zona intorno alla centrale nucleare in Ucraina la contaminazione ha aumentato soprattutto i livelli di iodio¹³¹ provocando un'epidemia di cancro alla tiroide nei bambini che, normalmente, non sono affetti da questa patologia. Come fa vedere la **figura 32** un aumento della contaminazione da I¹³¹ ha provocato un eccesso di esposizione a radiazioni gamma a livello della tiroide e quindi un aumento dei casi di cancro con un rischio relativo (RR) molto più ampio rispetto alle popolazioni di controllo (**figura 32**).

Figura 31**Dosi di radioattività ambientale liberate nel corso del 1900**

	Test nucleari (Anni '50-'60)*	Windscale, UK (1957)	Three Mile Island USA (1980)	Chernobyl (1986)
³ H	240000			
⁹⁰ Sr	604			
¹³¹ I	650000	0.7	0.0006	630
¹³⁷ Cs	910	0.02		70
Dose globale	2300000			600000

* dose liberata in PBq

Figura 32**Cancro tiroideo nelle popolazioni esposte intorno a Chernobyl (nati tra il 1971-1986)**

	Soggetti (x1000)	Casi	Casi attesi	R.R.
Kiev (Ucraina)	581	67	11	6
Minsk (Bielorussia)	357	41	6.8	6

Likhtarev et al., J Natl. Cancer Inst. 298, 897-903, 2006

In caso d'incidenti nucleari è stato suggerito che sarebbe opportuno somministrare ioduro di potassio alla dose di 30-100 mg/giorno, per bloccare l'assunzione di iodio da parte della tiroide, trattamento che è stato realizzato solo in Polonia dopo l'incidente di Chernobyl. Anche gli operai che lavoravano alla decontaminazione della centrale (liquidators) hanno un elevato rischio relativo (R.R.) di sviluppare cancro della tiroide (5.3 1 volte rispetto ai controlli non esposti, **figura 33**). Non si conoscono fino al momento presente gli effetti di questo incidente sull'incidenza di tumori in Europa occidentale, con l'eccezione di un aumento segnalato della leucemia infantile in Grecia (questi ultimi dati sono contestati da alcuni epidemiologi).

Le radiazioni ultraviolette sono un importante sorgente di mutazioni nelle cellule dei mammiferi. Le radiazioni ultraviolette vengono emesse dal sole e raggiungono la terra come UV A, B e C, le cui lunghezze d'onda sono riassunte nella **figura 34**.

Le radiazioni a lunghezza d'onda più corta (UVC) sono le più pericolose, ma vengono assorbite dall'atmosfera terrestre. Al contrario le radiazioni UVB e AVA raggiungono la superficie terrestre. Inoltre le radiazioni UVA raggiungono la cute umana a causa del famoso fattore I (I come idiozia) per l'abitudine di abbronzarsi con le lampade. Come dimostra la **figura 35** l'efficacia eritemigena delle tre varianti di radiazioni ultraviolette è diversa: infatti le UVB sono molto più capaci di indurre eritema delle UVA.

Figura 33

Cancro tiroideo nei "liquidators" di Chernobyl

R.R.: 5.31 (0.04-10.58, 95% CL)

Ivanov et al., Radiats Biol Radioecol. 46, 159-166, 2006

Figura 34

Raggi UV

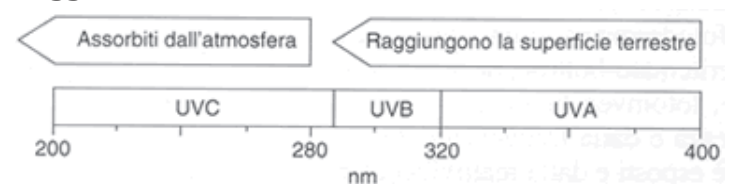
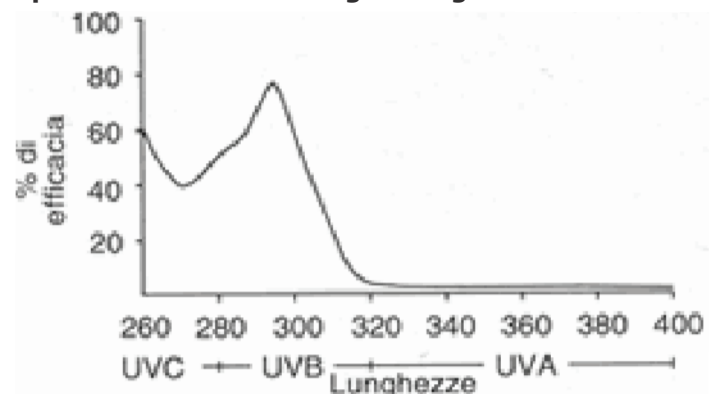


Figura 35

Spettro di azione eritemigeno degli UV



Le radiazioni ultraviolette penetrano nella pelle, ma siccome i massimi d'assorbimento del materiale cellulare sono nella zona delle UVB, queste radiazioni non raggiungono che in piccola percentuale il derma (figura 36). Al contrario le UVA penetrano in profondità nel derma e così possono danneggiare le cellule connettivali e vasali, nonché le cellule immunocompetenti.

Le radiazioni ultraviolette sono capaci di danneggiare il DNA perché provocano una attivazione della timina; questa attivazione, quando due molecole di timina sono adiacenti, porta alla formazione di un dimero di timina (figura 37), che ovviamente causa errori di lettura se non riparato.

Uno degli affetti importanti delle radiazioni ultraviolette è il cosiddetto foto-invecchiamento (figura 38), un fenomeno con una forte componente individuale legata al tipo di cute ed alla pigmentazione.

Come si vede nella figura 39 la pelle diventa irregolare, cosparsa di rughe e più sottile. Inoltre l'elasticità viene ridotta per la rottura delle fibre elastiche, derivante dall'attivazione delle metalloproteinasi. Queste risposte sono diverse a seconda del

Figura 36
Assorbimento cutaneo degli UV

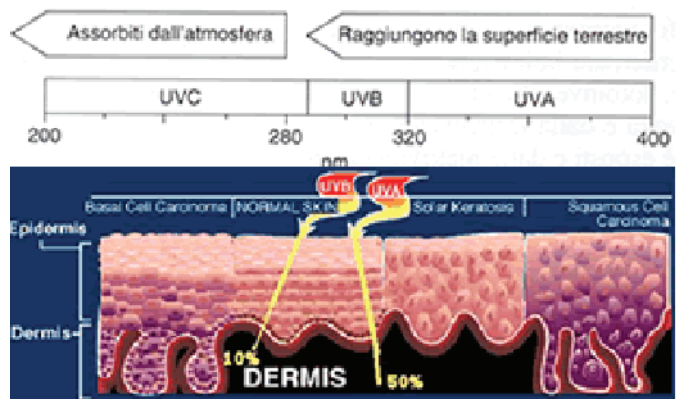


Figura 37
Dimeri di timina indotti da UV

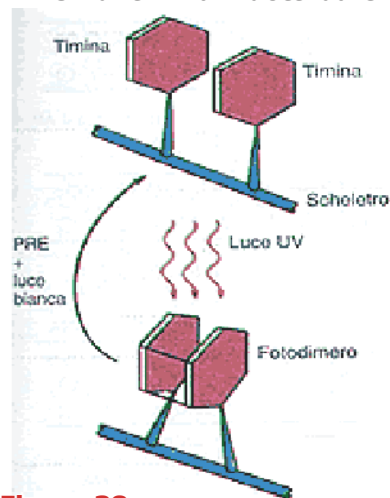
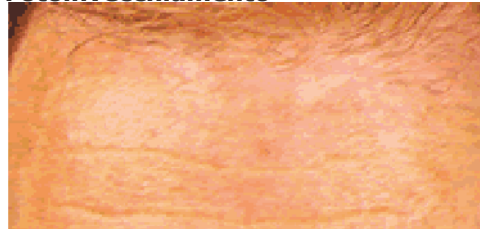


Figura 38
Fotoinvecchiamento



Terapia del fotoinvecchiamento:

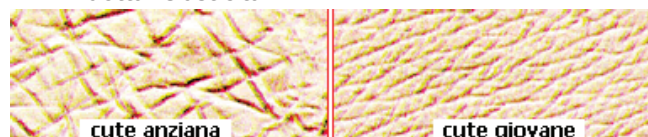
- tretinoina
- peeling
- creme all'acido glicolico
- filtri solari
- antiossidanti

Terapia delle cheratosi attiniche:

- diatermia
- crioterapia
- etretinato
- 5-fluorouracile topico

Figura 39
Invecchiamento cutaneo (Photoageing):

- riduzione dello spessore della cute
- ridotta elasticità



tipo di pelle, perché la pelle chiara (frequente nelle popolazioni europee) è più facilmente soggetta ai fenomeni di fotoinvecchiamento (figura 40).

I fenomeni più importanti indotti dalla eccessiva esposizione ai raggi ultravioletti sono la produzione di lesioni pre-cancerose e cancerose (il basalioma ed i cancri spinocellulari) (figura 41). Inoltre, l'esposizione a queste radiazioni porta a mutazioni nelle cellule contenenti la melanina (nevi) che sono all'origine di uno dei più aggressivi tumori, il melanoma (figura 42). La figura 43 mostra come

il melanoma abbia un'incidenza molto variabile nelle diverse parti del mondo, la massima essendo in Australia la minima in Kuwait (l'Italia è in posizione intermedia). Ciò è dovuto a fattori variabili di insolazione e di resistenza della pelle (la pelle chiara è un fattore di rischio, perché la melanina filtra una parte dei raggi UV). Un fattore di rischio importante è l'esposizione eccessiva alla luce solare, in particolare per i soggetti a pelle chiara. Infatti, è soprattutto in Australia con una popolazione di prevalente origine nord europea, che l'incidenza del melanoma ha raggiunto proporzioni catastrofiche.

Il melanoma è frequente in tutti i paesi occidentali, inclusa l'Italia (figura 44) per la moda delle abbronzature, e mette a particolare rischio i soggetti con pelle chiara. Come mostra la figura 45 il rischio di melanoma aumenta anche in seguito all'esposizione a lampade, ed è frequente in gruppi di popolazione (come i piloti e le hostess) che per motivi professionali (biglietti di aereo gratis per località tropicali) hanno

Figura 40

Effetto delle radiazioni solari nell'invecchiamento cutaneo
Brigitte Bardot anni 70



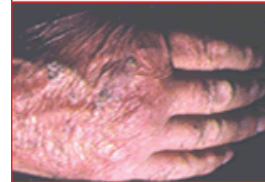
pelle da marinaio
effetto Saint Tropez

Brigitte Bardot anni 20



Figura 41

Cheratosi attinica,
epitelioma basocellulare



Fotocarcinogenesi
(depressione delle risposte immunitarie)

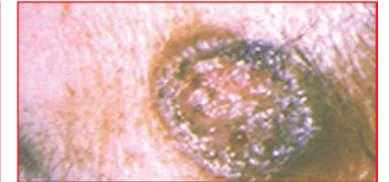


Figura 42

Esemplari di melanoma

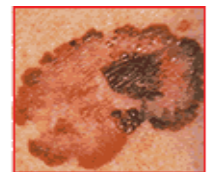
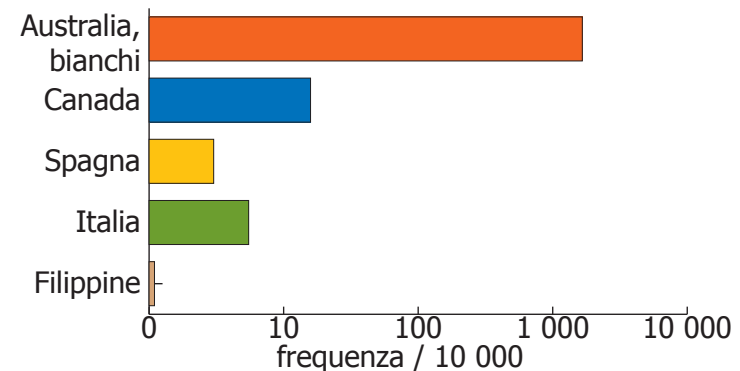


Figura 43

Incidenza annuale del melanoma nel mondo



Da dati della International Agency for Research on Cancer (IARC) URL <http://www-dep.iarc.fr> modificato

Figura 44

Melanoma in Italia (RR= rischio relativo rispetto al controllo)

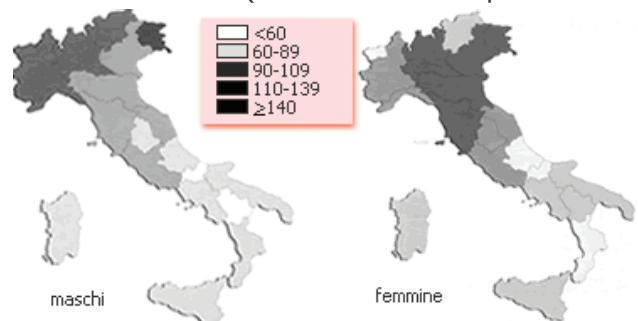


Figura 45

RR di melanomi di soggetti che fanno le lampade (rischio annuale per numero di applicazioni calcolato (UK): 100 casi/anno)

- 0 RR 1
- 1-10/anno RR 2.7
- >10/anno RR 1.8
- 1-125 volte RR 2.3
- >250 RR 1.5

Westerdahl et al., Int J Cancer. 87, 145-150, 2000

maggior tendenza ad esporsi ad alti livelli di radiazioni ultraviolette (**figura 46**).

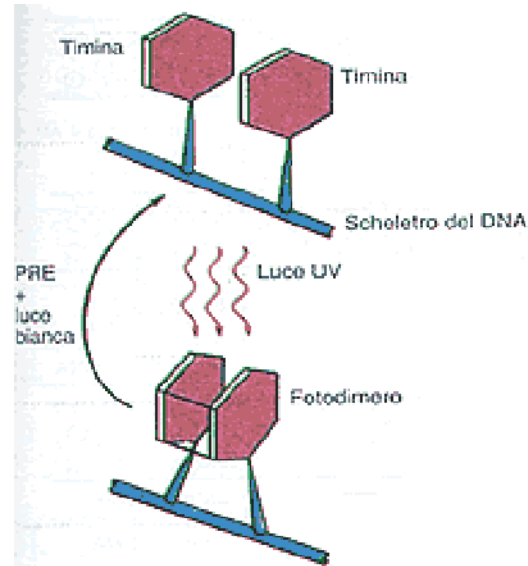
Il caso delle radiazioni ultraviolette consente anche di apprezzare pienamente il ruolo dei fenomeni di riparazione del DNA. Infatti la nostra cute invecchierebbe e si coprirebbe di tumori in pochi anni se non esistesse nelle nostre cellule il cosiddetto enzima fotoriattivante (**figura 47**) che è capace di riconoscere e di riparare i dimeri di timina. I processi di riparazione del DNA sono molti e molto complicati (**figura 48**). Il sistema più importante è l'escissione di basi, illustrato nella **figura 49**. L'abbondanza dei sistemi enzimatici utilizzati dimostra quanto sia importante per le cellule possedere efficienti sistemi di riparazione. Esistono infatti enzimi specifici che sono in grado di rimuovere gruppi alchilici dalle basi del DNA o rimuovere specifici addotti. Questo processo avviene mediante il riconoscimento delle zone alterate da parte di enzimi selettivi, l'escissione di un segmento di DNA (di venti o trenta basi, rispettivamente per le cellule procariote o eucariote) e la successiva replicazione del filamento danneggiato ad opera di specifiche polimerasi.

Figura 46
Dipendenti di linee aeree e rischio di melanoma al tronco (U.K.)

- RR 2.18 M
- RR 3.66 F

Buja et al., J Womens Health 15, 98-105, 2006

Figura 47
Enzima di riparazione fotoriattivante (PRE): indotti da UV

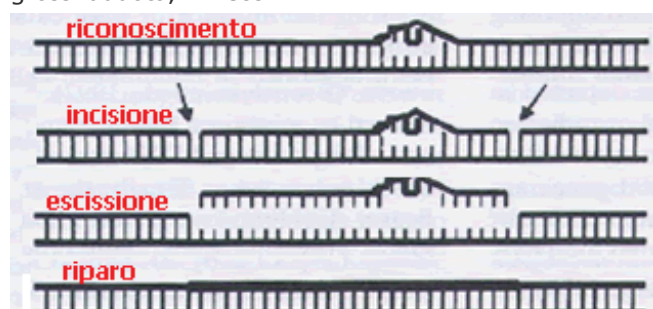


Dimerizzazione della timina da UV

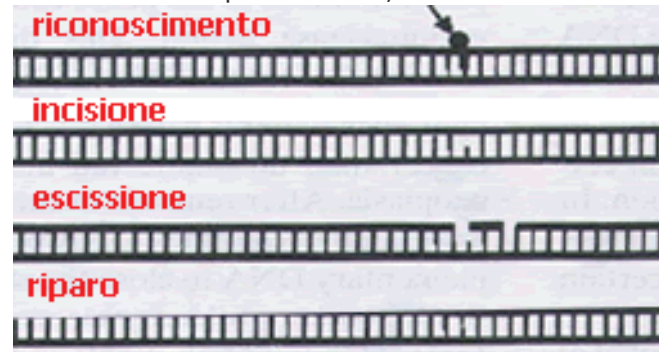
Figura 48
Riparazione del DNA

tipo	enzimi responsabili
rimozione diretta del danno	alchiltrasferasi
	enzima fotoriattivante
riparazione per escissioni di basi	glicosilasi
	endonucleasi
riparazione per escissione di nucleotidi, di dimeri di pirimidina; riparazione di addotti ingombranti	endonucleasi, esonucleasi, polimerasi e ligasi
riparazione post-replicativa	

Figura 49
Riparazione per escissione di nucleotidi o di basi: grossi addotti, TT ecc.



Escissione di basi: piccoli addotti, basi alchilate etc.



Riparazione del DNA

Se questi sistemi di riparazione sono mal funzionanti, si originano sindromi caratterizzate da invecchiamento e da tumori precoci. Il soggetto della **figura 50** ha una alterazione ereditaria di un gene del riparo (il gene XP, da xeroderma pigmentosum). I soggetti con XP inattivato manifestano un rapido invecchiamento cutaneo, che si traduce nella formazione di lesioni gravi, fino al cancro, nelle prime età della vita. Se si espone una cellula cutanea di un soggetto con XP a radiazioni ultraviolette, il danno di una dose di radiazione è molto più che in una cellula normale, a causa proprio dell'inefficienza dei sistemi di riparo (**figura 51**).

Figura 50

Individuo affetto da xeroderma pigmentosum (XP)



Figura 51

Sensibilità agli UV delle cellule di un soggetto con XP

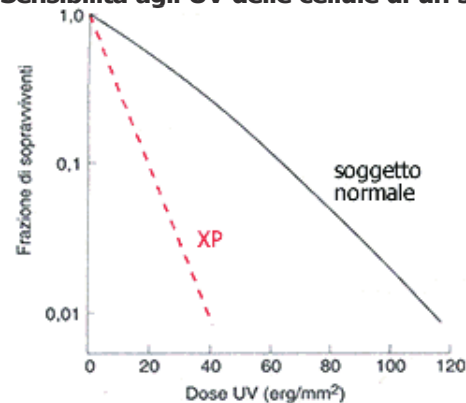


Figura 52

Principali classi di mutageni chimici

analoghi delle basi	bromodeossiridina, 2-aminopurina
sostanze che reagiscono con il DNA	idrossilamine, acido nitroso, formaldeide, agenti alchilanti
intercalanti	acridine, proflavina

Esistono altre malattie importanti dovute ad alterazione dei sistemi di riparo: tra queste la cosiddetta HNPCC (Human Non Poliposis Colon Cancer) nella quale i sistemi di riparo sono mal funzionanti, ed i soggetti sviluppano tumori precoci del colon e d'altri organi.

Un altro importante gruppo di agenti mutageni, è rappresentato dai mutageni chimici. Ci sono diversi meccanismi con i quali questi mutageni provocano danni del DNA (**figura 52**).

Alcune di queste sostanze sono analoghi delle basi (**figura 53**) altri invece reagiscono con le basi (**figura 54**) e le modificano chimicamente o, come gli agenti alchilanti (**figura 55**) trasferiscono gruppi alchilici alle basi del DNA provocando errori di accoppiamento delle basi (**figura 56**); altri ancora sono capaci di inserirsi tra le basi medesime (agenti intercalanti, **figura 57**). Tutte le alterazioni delle basi del DNA, come le mutazioni o le alchilazioni, modificano il codice genetico e provocano mutazioni.

Figura 53
Incorporazione di analoghi di basi: la BU (bromodesossiridina) si può appaiare con la guanina

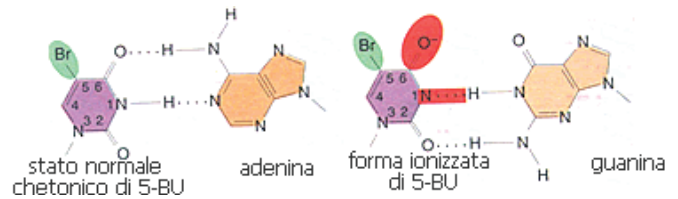


Figura 54
La citosina viene modificata chimicamente e si appaia così con l'adenina

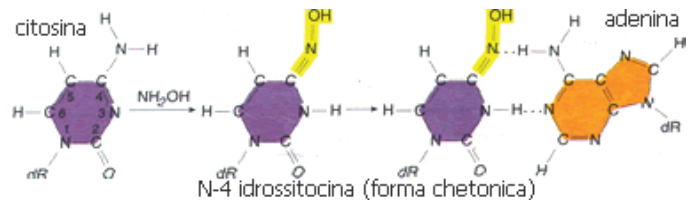


Figura 55
Struttura chimica dell'etilmetansulfonato e della nitrosoguanidina, due potenti alchilanti

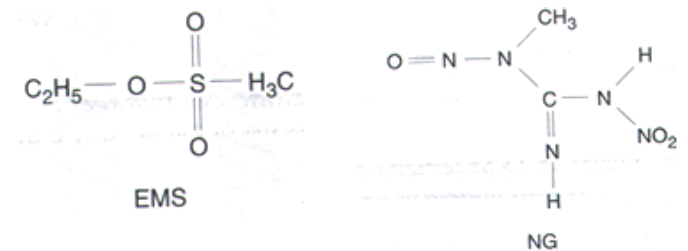


Figura 56
Errori di appaiamento indotti da agenti alchilanti

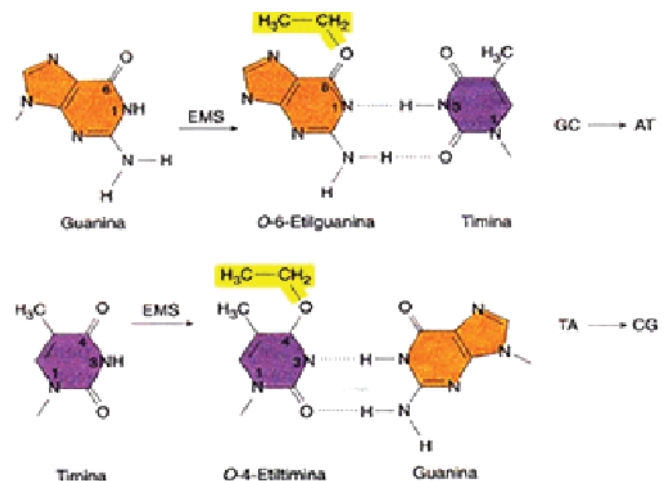
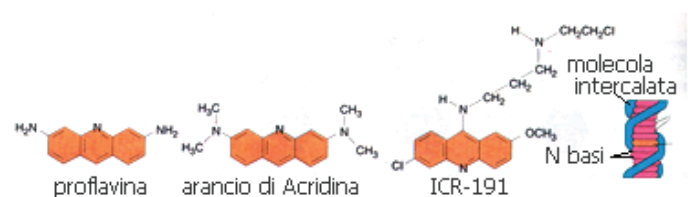


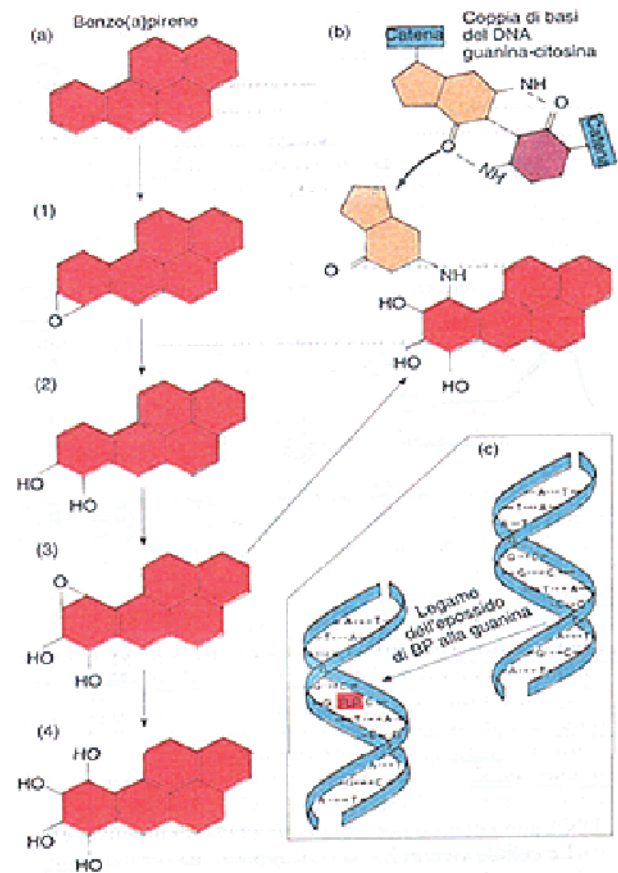
Figura 57
Meccanismo d'azione di alcuni agenti intercalanti



Un meccanismo particolare è alla base della formazione dei cosiddetti addotti. Questi sono dei complessi molecolari che si formano per reazione chimica tra alcune molecole reattive e le macromolecole (proteine, DNA e RNA). Effetti funzionali importanti sono conseguenti alla formazione di addotti al DNA. L'esempio classico di questi addotti è rappresentato dagli IPA, o idrocarburi policiclici aromatici (figura 58). Gli IPA sono capaci dopo attivazione metabolica di legarsi al DNA, formando voluminosi addotti che, se non rimossi, portano ad errori di lettura del codice genetico. Quasi tutte le sostanze che agiscono con questo meccanismo hanno bisogno di una precedente attivazione metabolica. Esistono cioè all'interno delle cellule dei meccanismi per i quali una sostanza non tossica (ad esempio un IPA come il benzo(a)pirene, B(a)P) vengono ossidati da enzimi presenti in alcune delle nostre cellule (CYP450, nel fegato, nel rene, nell'intestino, nei macrofagi presenti negli alveoli polmonari) e diventano in questo modo sostanze capaci di legarsi col legame covalente al DNA (agenti elettrofili). Questi addotti si formano anche con proteine, lipidi e RNA, ma in questo caso hanno effetti funzionali meno importanti. Infatti, nuove proteine possono sempre essere sintetizzate se l'apparato ereditario delle cellule è indenne.

Figura 58

Meccanismo d'azione mutageno e cancerogeno del benzo(a)pirene: addotti voluminosi che disturbano la sintesi del DNA



rox

lezione n. 6

Test di mutagenesi

Le sostanze chimiche o i trattamenti fisici che sono capaci di indurre mutazioni vengono definiti "mutageni". Per studiare l'attività mutagena di una sostanza si utilizzano i cosiddetti "test di mutagenesi", che sono anche conosciuti come "test di mutagenesi a breve termine", dal momento che richiedono tempi sperimentali relativamente brevi.

I test di mutagenesi indicano se una sostanza è in grado o no di produrre alterazioni del materiale genetico, e non sarebbero possibili se non esistesse una sostanziale somiglianza tra cellule tra loro lontane, legata alla comune struttura genetica (**figura 1**). Infatti, il codice genetico è lo stesso in tutti gli organismi viventi, anche se il numero di basi che fanno parte del genoma di una cellula varia da circa 10^9 nelle cellule di mammifero a 10^7 nelle cellule di lievito. Le piante hanno un contenuto intermedio, ma possono passare rapidamente ad una condizione di poliploidia, aumentando il contenuto di DNA. I mitocondri sono probabilmente organismi unicellulari anticamente fagocitati dalle cellule eucariote ed hanno circa mille nucleotidi di informazione genetica, con capacità di riparo inferiore rispetto al DNA nucleare.

Come abbiamo visto le cellule sono soggette ad alterazioni del codice genetico e la frequenza di queste alterazioni è oggetto di discussione nella comunità scientifica, dove esistono, come dovunque, ottimisti e pessimisti. La **figura 2** riporta le valutazioni di un famoso scienziato americano (Bruce Ames, inventore dell'omonimo test). Come abbiamo visto il numero

Figura 1

I test di mutagenesi "a breve termine"

- indicano se una sostanza chimica (o un trattamento fisico) può indurre mutazioni
- sono basati sul fatto che il DNA è uguale in tutte le cellule per cui è possibile studiare l'attività mutagena anche su organismi semplici



S. Cerevisiae con gemme



Cellule di mammifero in riproduzione

Figura 2

Errori quotidiani nel DNA delle cellule di mammifero

- 26000 perdite di basi (purine)
- 350 deaminazioni della citosina
- 10000-50000 alchilazioni (metilazioni della guanina da S-adenosilmetionina)
- 50000 dimerizzazioni della timina
- 100000 single-strand breaks
- 1000-5000 basi ossidate
- totale degli errori del DNA: circa 200000 (frequenza 2×10^4)

Ames et al., Basic Life Sci. 38, 529-535, 1986

di lesioni effettive del DNA è minore a causa della accuratezza dei sistemi di riparazione ed è stimata intorno a 10^{-7} (**figura 3**).

I test di mutagenesi sono utilizzati anche per la previsione dell'effetto cancerogeno di una sostanza chimica. Infatti, come si vede nella **figura 4**, la maggior parte dei mutageni, proprio perché provocano mutazioni (alcune delle quali possono essere a carico di oncogeni o geni oncosoppressori) frequentemente sono in grado di produrre tumori. Tuttavia esistono alcuni mutageni che non provocano tumori (ad esempio la quercetina, sostanza fenolica presente in numerosi vegetali può indurre mutazioni ma non è cancerogena), mentre esistono cancerogeni non mutageni (ad esempio alcuni ormoni). Se le mutazioni interessano cellule germinali questo si traduce in malformazioni (teratogenesi). I test di mutagenesi indicano quindi anche se una sostanza può essere teratogena, anche se una certezza in questo senso si può ottenere solo con specifici test. Anche nel caso della corrispondenza tra effetti mutageni e teratogeni, esistono zone di sovrapposizione e di differenza (cioè esistono mutageni non teratogeni e teratogeni non mutageni) (**figura 5**).

La **figura 6** indica i più comuni sistemi sperimentali per lo studio dell'attività mutagenica. Questi sistemi utilizzano cellule e organismi diversi (lievito, salmonelle, cellule di mammifero, drosofile); i metodi sono stati messi a punto negli anni '70-80 e sono ancora di uso corrente.

Figura 3 Errori quotidiani nel DNA delle cellule di mammifero

- Frequenza stimata di mutazioni $\sim 10^4$
- Grazie al riparo la frequenza di mutazioni si riduce a $\sim 10^{-7}$

Figura 4 Premessa prima dei test di mutagenesi: la conoscenza della attività mutagenica è utile perché correlata nelle cellule somatiche ad "attività" cancerogena



1. mutageni-cancerogeni (IPA, ammine aromatiche, ecc.)
2. mutageni non cancerogeni (quercetina, S-adenosil-metionina ecc.)
3. cancerogeni non mutageni (alcuni ormoni sessuali, TCDD ecc.)

Figura 5 Premessa seconda dei test di mutagenesi: la conoscenza della attività mutagenica è utile perché correlata nelle cellule germinali a quella teratogena



1. mutageni-teratogeni (metotrexate, mostarde azotate, ciclofosfamide, ecc.)
2. mutageni non teratogeni (quercetina, S-adenosyl-metionina, ecc.)
3. teratogeni non mutageni (alcol, ormoni, talidomide, ecc.)

Figura 6 Schema di una batteria di test di mutagenesi

Organismo	Sistema di rilevamento	Tempo necessario
Batteri	Mutazioni geniche Riparazione del danno al DNA	Meno di 5 giorni
Lieviti	Mutazioni geniche Aberrazioni cromosomiche	Meno di 10 giorni
Drosofila	Mutazioni geniche Mutazioni di cellule germinali Aberrazioni cromosomiche	Meno di 30 giorni
Cellule di mammifero	Mutazioni geniche Aberrazioni cromosomiche Riparazione di danni al DNA Scambi tra cromatidi fratelli	Meno di 30 giorni
Roditori (in vivo)	Mutazioni geniche Aberrazioni cromosomiche	Meno di 700 giorni

Il più famoso test è stato messo a punto da un ricercatore americano, Bruce Ames, e porta il suo nome. Questo test è il sistema di screening più utilizzato, perché è facile da mettere a punto e abbastanza affidabile.

Il **test di Ames** utilizza delle particolari cellule di *Salmonella typhimurium* autotrofe per l'istidina (cioè incapaci di sintetizzarla per una mutazione puntiforme del gene dell'istidina, **figura 7**). Questa mutazione è instabile e può essere corretta (il batterio ritorna "wild type", e viene chiamato "revertante", **figura 8**).

Quando il batterio è revertante, diventa in grado di crescere anche senza istidina, e forma colonie su piastre con terreno carente di istidina che possono essere facilmente contate. La coltura di partenza produrrà poche colonie (**figura 9, a destra**), mentre la coltura che è stata trattata con un mutageno contiene più cellule "revertanti" e quindi sviluppa più colonie (**figura 9, a sinistra**). Le cellule di *Salmonella typhimurium* usate nel test di Ames sono senza parete (rfa, più permeabili alle sostanze chimiche) e con una certa fragilità genetica (Δ uvrB, mancanza di riparazione da UV) (**figura 10**); possono anche avere un plasmide di resistenza alla penicillina (PKM101), e permettono di identificare effetti a basse concentrazioni di mutageno (fino a pochi ng).

Figura 7

Nel test *Salmonella typhimurium*-microsomi o test di Ames si utilizzano ceppi mutanti di *Salmonella typhimurium* auxotrofi per l'istidina

(auxotrofi = batteri che a causa di una mutazione nei geni per la sintesi dell'istidina richiedono istidina nel mezzo di coltura per moltiplicarsi)

Figura 8

L'attività mutagena viene misurata saggiando la capacità del composto di indurre una mutazione di ritorno nei geni dell'istidina

se il composto è mutageno, provoca instabilità mutazionale nel DNA dei batteri, che riporta il batterio alla forma "wild type" che cresce senza istidina

Figura 9

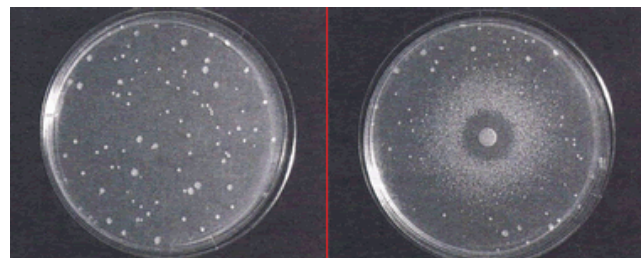


Figura 10

Caratteristiche genetiche dei ceppi di *Salmonella typhimurium* usati nel test di Ames

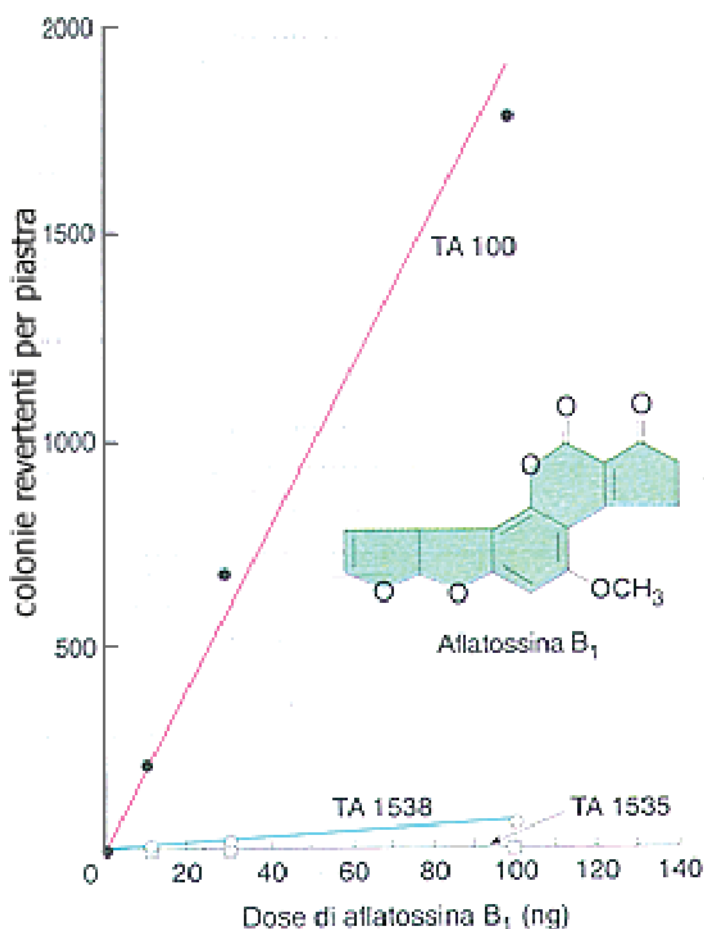
Ceppo	Mutazione nell'operone in his	Parete	Riparazione	Plasmide pKM101
TA1535	hisG46	rfa	Δ uvrB	—
TA1537	hisC3076	rfa	Δ uvrB	—
TA1538	hisD3052	rfa	Δ uvrB	—
TA98	hisD3052	rfa	Δ uvrB	+
TA100	hisG46	rfa	Δ uvrB	+
TA97	hisD6610	rfa	Δ uvrB	+
TA102	pAQ1his G428/ Δ his	rfa	Δ uvrB	+

Il test di Ames è reso possibile dalla presenza di un sistema di attivazione metabolica (**figura 11**) che viene inserito nel test mediante l'aggiunta alla piastra di un omogenato di fegato di ratto trattato con induttori (come i PCB o Aroclor; in tal modo si ottengono nel fegato alti livelli di CYP450 nella frazione detta "S9", reticolo endoplasmico, ottenuto per centrifugazione a 9000 Svedberg di un omogenato di fegato). In questo modo le salmonelle, se è presente un mutageno chimico, aumentano il tasso di mutazione (**figura 11, a destra**, piastra superiore), e questo rende possibile ad un certo numero di cellule di crescere anche in assenza di istidina (reversione al carattere wild type o "selvaggio"). In assenza di S9 non si sviluppa invece nessuna colonia (**figura 11, a destra**, piastra inferiore).

Da ogni cellula "revertita" (mutata) si forma una colonia, che può essere facilmente contata su una piastra da batteriologia. In questo modo, la presenza di un mutageno provoca un aumento del numero di colonie sulla piastra, che passa da 20-100 del controllo a diverse centinaia nella piastra con mutageno. Un esempio di un risultato sperimentale è mostrato nella **figura 12**, nella quale dosi da 20 a 140 ng di aflatossina B₁, un potente mutageno-cancerogeno prodotto da alcuni tipi di muffa che cresce su alimenti mal conservati, provoca un aumento della frequenza di "reversioni", cioè di mutazioni, da alcune decine nel controllo fino a circa 2000 per piastra in presenza di S9 (ceppo TA100). Come si può vedere la risposta in questo caso è perfettamente lineare. L'uso di un buon

Figura 11**Figura 12**

Esempio di Attività mutagenica: l'Aflatossina B₁



S9 è fondamentale (**figura 13**). Infatti l'S9 ottenuto da animali non trattati con un induttore del citocromo P450 dà una risposta mutagenica assai bassa.

La maggior parte dei cancerogeni ha effetti mutageni sui batteri e la maggioranza dei non cancerogeni è non mutagenica. Come mostra la **figura 14**, questa corrispondenza varia in funzione del tipo di sostanza chimica.

Un tipo importante di test di mutagenesi utilizza l'induzione di aberrazioni cromosomiche in cellule di mammifero (**figura 15**). Una famosa "donatrice involontaria" (a quei tempi non c'erano i comitati etici) è una signora americana degli anni trenta, Henriette Lacks, origine delle cellule "immortali" di cancro della cervice uterina, le cosiddette cellule HeLa. Le aberrazioni sono evidenziate con metodi morfologici in piastre metafasiche di cellule trattate in vitro con un mutageno (**figura 16**).

Figura 13
Effetto del pretrattamento con sostanze inducenti il P450 sulla attivazione metabolica di omogenati di fegato di ratto

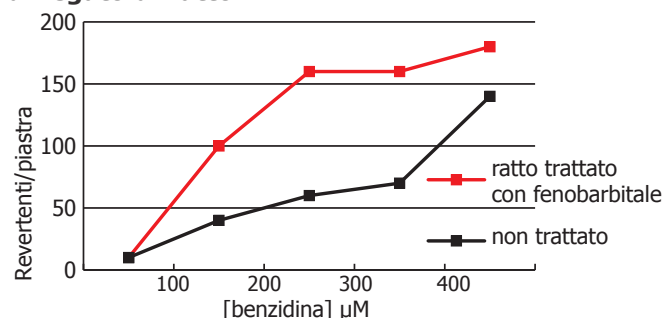


Figura 14
Correlazione tra attività mutagenica (test di Ames) e attività cancerogena di varie sostanze

Categorie di composti	Cancerogeni rivelatesi mutageni nei batteri	Non cancerogeni e non mutageni sui batteri
Ammine aromatiche	23/25 (92%)	10/12 (83%)
Aromatici policiclici	26/27 (96%)	7/9 (78%)
Esteri, epossidi, carbammati	13/18 (72%)	5/9 (55%)
Nitrosammine	20/21 (95%)	2/2 (100%)
Alogenuri alchilici	26/27 (96%)	1/3 (33%)
Composti organici diversi	1/6 (17%)	13/13 (100%)

Figura 15
Aberrazioni cromosomiche in cellule umane di cancro cervicale

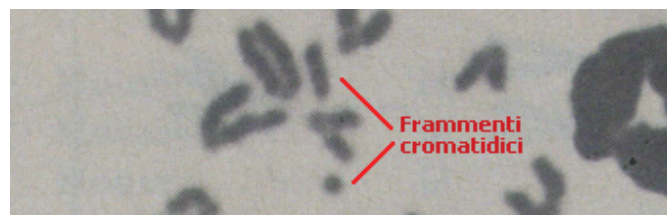


Figura 16
Henriette Lacks: "madre" delle cellule HeLa (cellule di cancro della cervice "immortali")



Circa 40000 articoli nel Medline pubblicati con le cellule HeLa fino al 2000

Il trattamento con la sostanza chimica può essere fatto anche in vivo, ed in questo caso si prelevano delle cellule idonee dall'animale da esperimento (es. cellule del midollo osseo) o dall'uomo (linfociti periferici) e si studia nei soggetti esposti (**figura 17**) se c'è un aumento delle anomalie genetiche (formazione di micronuclei, cioè di frammenti separati di cromosoma, o altre alterazioni (perdite o scambi tra frammenti di cromosomi) o alterazioni del numero di cromosomi). Questi test sono frequentemente usati nell'animale da esperimento e ci dicono (**figura 18**) se una sostanza (in questo caso lo stirene ossido) provoca aberrazioni cromosomiche in vivo.

Un altro sistema frequentemente utilizzato è quello degli scambi di cromatidi fratelli (sister chromatide exchange, SCE, **figura 19**) con il quale si colorano in modo differenziale i due cromatidi di ogni cromosoma di una cellula (ad esempio facendo crescere la cellula in presenza di bromodeossiridina (BrdU), che viene incorporata nel DNA (il DNA contenente BrdU risulta diversamente fluorescente se colorato in Giemsa, **figura 20**). Nel corso della pre-mitosi, i due cromatidi si scambiano materiale genetico e questo scambio aumenta in condizioni di instabilità genetica o sotto l'effetto di un mutageno. Contando il numero di SCE per cellula (**figura 21**) è possibile evidenziare l'esposizione della cellula (o dell'organismo nel caso di esperimenti in vivo) ad un agente mutageno. Un esempio classico è riportato nella **figura 22**, con un antitumorale di comune uso, la ciclofosfamida.

Figura 17

I test di aberrazioni cromosomiche in vivo sono basati sulla capacità di una sostanza chimica di indurre aberrazioni cromosomiche in cellule somatiche di un animale da esperimento dopo esposizione in vivo (anche nell'uomo si può valutare la presenza di aberrazioni cromosomiche in soggetti esposti a sostanze tossiche, come ad es. il benzene)

Figura 18

Aberrazioni nucleari in midollo osseo di topo trattato con varie dosi di ossido di stirene

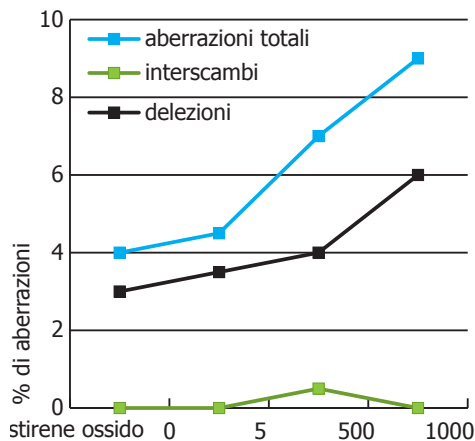


Figura 19

Sister chromatide exchange (SCE) scambio tra cromatidi di uno stesso cromosoma

- Molti mutageni aumentano il numero di SCE (aumentando il numero di rotture del DNA, e quindi di SCE)
- Gli SCE sono evidenziabili con una colorazione differenziale dei cromatidi fratelli

Figura 20

Si fanno replicare i cromosomi in presenza di BrdU e si colorano con il metodo Giemsa

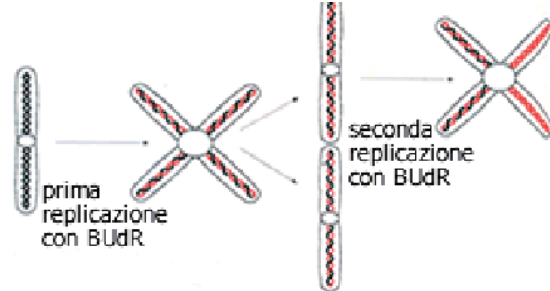


Figura 21

Scambi tra cromatidi fratelli in cellule di mammifero

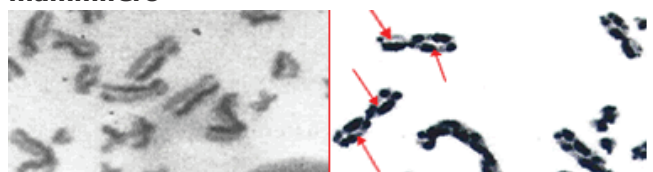
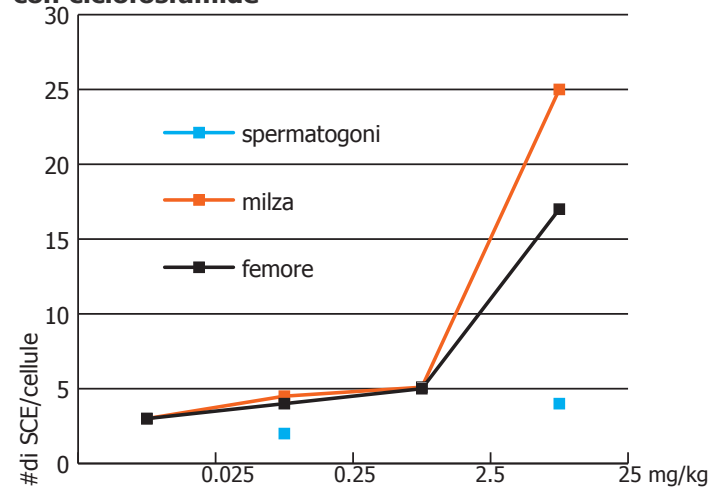


Figura 22

Frequenza di SCE in vari organi di topo trattato con ciclofosfamide



I test di mutagenesi sono molto utili perché consentono di estrapolare dati di attività mutagena ottenuti su organismi semplici (come la salmonella o il lievito) a cellule o organismi "superiori" (c'è da chiedersi quanto sia vero che gli esseri umani siano "organismi superiori") (figura 23). Inoltre hanno tempi di esecuzione e costi abbastanza bassi. I test di citogenetica hanno l'ulteriore vantaggio di essere condotti su cellule di mammifero in vitro o su mammiferi in vivo, e sono quindi facilmente estrapolabili agli esseri umani, in larga misura affini ai mammiferi, a parte lo sviluppo della corteccia cerebrale (figura 24). Per questo motivo i test di mutagenesi sono utilizzati ampiamente ed inseriti nello screening di sostanze di interesse industriale, ambientale o farmacologico. Ogni paese o area industriale utilizza diverse combinazioni di test in vivo ed in vitro per lo screening di sostanze chimiche o farmacologiche e per contaminanti ambientali (figura 25).

Figura 23

Perché sono utili i test di mutagenesi?



perché consentono di misurare gli effetti di una sostanza nella piramide evolutiva

Figura 24

Metodi simili possono essere usati negli animali da esperimento e nell'uomo-donna (es. aberrazioni cromosomiche ecc.)

Figura 25

Test richiesti per certificare l'assenza di attività mutagena di una sostanza

Paese	Tipo di composto	Test richiesti
USA	Inquinanti ambientali Sostanze di interesse medico	Test di mutazione genica nei batteri Test di Ames Mutazioni nei mammiferi Riparo del DNA Trasformazione neoplastica in vitro
EU	Sostanze industriali tra 1 e 10 T/a S. industriali > 10 T Sostanze farmaceutiche	Test di Ames Test di citogenetica 'in vitro' Test di citogenetica 'in vivo'

rox

lezione n. 7

Cancerogenesi sperimentale

La cancerogenesi sperimentale è quel settore delle scienze biomediche che studia i possibili effetti cancerogeni di una sostanza, cioè la sua capacità di indurre tumori. L'induzione di tumori segue regole simili nei mammiferi da esperimento e negli esseri umani e gli esperimenti ottenuti con animali sono predittivi sulla possibilità di una sostanza di indurre tumori umani.

Molte sostanze chimiche, le radiazioni UV e le radiazioni ionizzanti inducono mutazioni, che provocano tumori quando modificano zone particolari del genoma, come gli oncogeni (geni che regolano processi cellulari fondamentali, come il ciclo cellulare o la regolazione della segnalazione intra-extracellulare) o i geni oncosoppressori (che una volta mutati rimuovono meccanismi di controllo di funzioni cellulari fondamentali, come la mitosi) (figura 1).

La lista di oncogeni e geni oncosoppressori è molto lunga (circa 250, per il momento, su 30000 geni). Tra questi riportiamo alcuni esempi, dai quali risulta evidente come questi geni regolino funzioni fondamentali per l'omeostasi cellulare (figura 2) o sistemi di segnalazione (figura 3). Con i progressi della biologia dei tumori sono adesso note le principali mutazioni di oncogeni e geni oncosoppressori presenti nei tumori umani e sperimentali, e si conoscono almeno alcuni dei meccanismi con i quali le mutazioni si traducono in alterazioni o delezioni di proteine regolatrici che portano alla trasformazione di una cellula normale in cellula tumorale.

Figura 1

Gli **oncogeni e i geni oncosoppressori** sono geni essenziali per il funzionamento cellulare, la cui mutazione porta a alterazione della funzione (oncogeni) o inattivazione della funzione (geni oncosoppressori) conferendo alla cellula un vantaggio evolutivo sulle cellule normali (comportamento neoplastico)

Comportamento neoplastico:

- Aumentata proliferazione
- Perdita della adesività cellulare
- Invasività
- Sdifferenziamento (perdita delle funzioni cellulari del tessuto di origine)

Figura 2

Esempi di fattori cellulari di controllo alterati nella cancerogenesi

Funzione del prodotto	Gene
Fattore di trascrizione nucleare, induttore di apoptosi (oncogene)	P53
Proteina che ripara il danno al DNA	hMLH1
Proteina deputata all'adesività ed alla riproduzione cellulare (gene oncosoppressore)	Apc

Figura 3

Funzione del prodotto	Geni
Fattori di crescita	Sis, Fgf
Recettori per tirosina chinasi	Met, Neu
Tirosina chinasi	Src, Ret
Proteine G associate alle membrane	Ras, Gip-2
Fattori di trascrizione nucleari	Myc, Fos, Jun

In aggiunta a fenomeni di mutazione che interessano le cellule somatiche (che non sono ereditarie) esistono mutazioni che interessano le cellule germinali e che quindi si trasmettono con la prole. Alcune di queste mutazioni provocano tumori umani comuni. Nella **figura 4** viene descritta una di queste ben conosciute sindromi ereditarie, la poliposi familiare del colon (FAP), nella quale i soggetti affetti e spesso diversi membri della loro famiglia hanno una mutazione trasmessa secondo le leggi di Mendel, di un gene, detto APC (**figura 4**); spesso la mutazione interessa una zona precisa del gene, detta MCR (mutation cluster region), che porta alla formazione di una proteina APC troncata e inattiva (**figura 5**). APC è una proteina che si lega ad altre proteine, tra cui la beta-catenina, e ciò innesca la fosforilazione e la degradazione della beta-catenina per proteolisi (**figura 6**). La via di APC/beta-catenina è utilizzata da sostanze regolatrici, che interagiscono con i recettori wnt sulla parete cellulare e regolano la proliferazione e il differenziamento cellulare in molti tessuti (pathway wnt).

Se APC è troncata a causa di una mutazione, o la beta-catenina è mutata nel sito di fosforilazione che regola la sua degradazione, la degradazione della beta-catenina non avviene e la proteina, trasferendosi nel nucleo in quantità non fisiologica, attiva permanentemente, attraverso il fattore TCF, una serie di geni regolatori, tra i quali MIC. Ciò si traduce in una proliferazione incontrollata, che porta alla formazione a livello intestinale di numerosi polipi e di cancro (**figura 7**).

Figura 4
Esistono famiglie in cui molti componenti sviluppano tumori

Questi soggetti sono portatori dalla nascita di mutazioni in geni onco-oppresori, la cui perdita o inattivazione causa sviluppo tumorale in determinati organi (es. la inattivazione del gene APC, da Adenomatous Polyposis Coli, dà tumori nel colon)

Figura 5
Struttura del gene APC

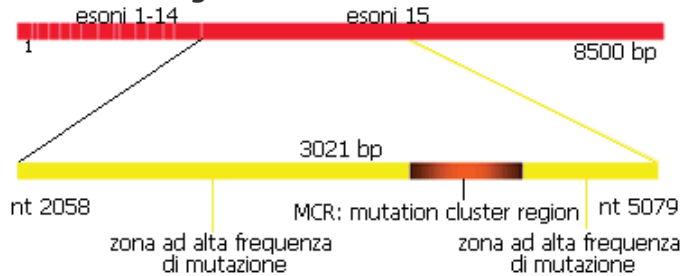


Figura 6
Sistema normale della regolazione della mitosi wnt, con APC e beta-catenina funzionanti

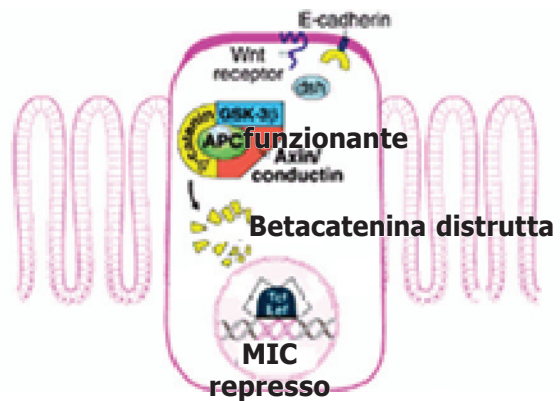
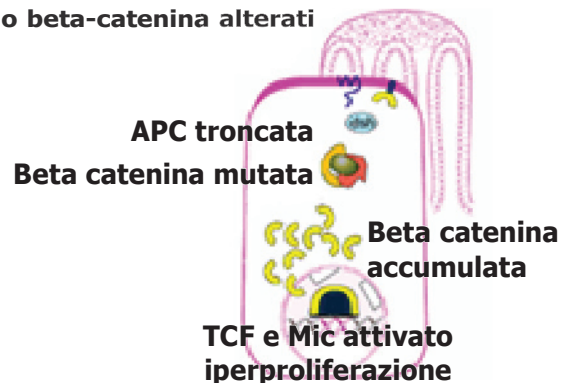


Figura 7
APC o beta-catenina alterati



Nella **figura 8** sono riassunte le finalità dei test di cancerogenesi, cosiddetti a lungo termine. Negli animali da esperimento che si usano in laboratorio, come negli esseri umani, è possibile l'insorgenza di tumori spontanei.

I tumori spontanei hanno una frequenza variabile nelle specie diverse e una diversa localizzazione (come succede nei ratti F344 e nei topi B6C3F1). C'è inoltre una differenza importante tra maschi e femmine (**figura 9**), che non riguarda solo i tumori dell'apparato riproduttivo.

I tumori spontanei possono rendere difficile l'interpretazione degli esperimenti, perché creano un certo "rumore" che confonde i risultati dell'esperimento, ed è per questo che si preferiscono specie ad incidenza bassa di tumori spontanei (**figura 10**). Infatti, come dimostra la **figura 11**, tanto più frequenti sono i tumori spontanei, tanto maggiore dovrà essere il numero di animali da utilizzare in un esperimento di cancerogenesi per avere un aumento significativo dell'incidenza dei tumori. Infatti, l'aumento della frequenza di tumori indotto dal trattamento con cancerogeno dovrà essere abbastanza alto per superare il rumore sperimentale

Figura 8

Test di cancerogenesi a lungo termine:

sono esperimenti in cui viene valutata la capacità di una sostanza chimica o di un trattamento fisico (es. Rx) di indurre tumori nell'animale da esperimento in seguito a esposizione cronica per periodi relativamente lunghi (da 6 a 24 mesi per il ratto e il topo)

Figura 9

Frequenza di tumori spontanei in ratti F344, topi B6C3F1, maschi e femmine

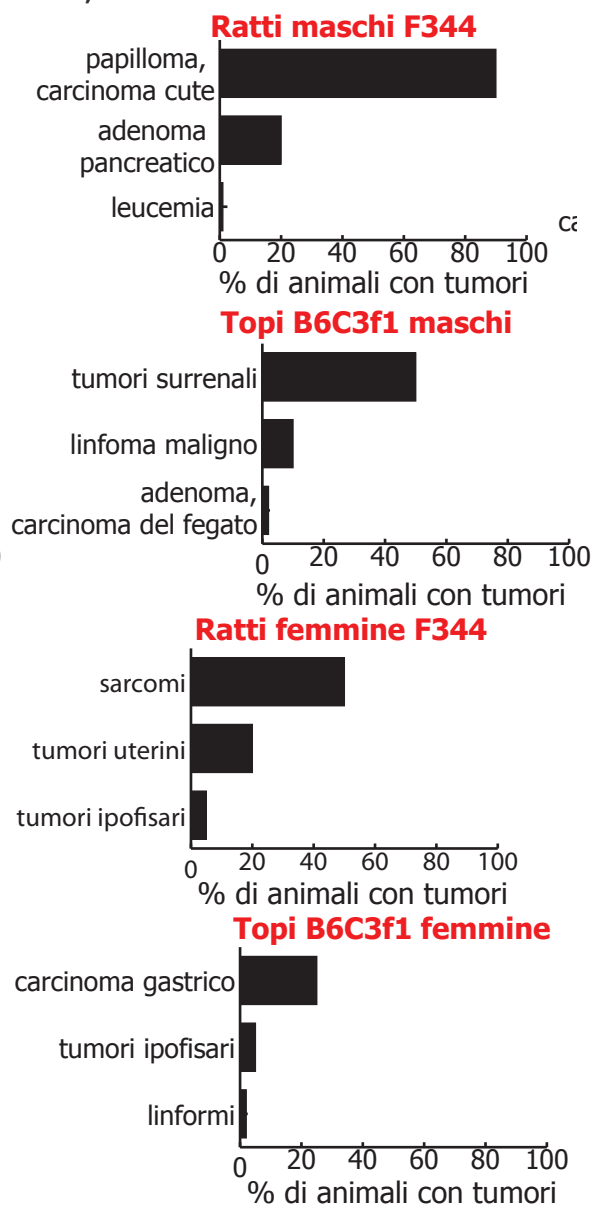


Figura 10

Negli esperimenti di cancerogenesi è necessario una bassa frequenza di tumori spontanei negli animali perché la presenza di tumori spontanei rende difficile la valutazione dei risultati

legato ad un alto numero di tumori negli animali di controllo (non trattati).

Nella **figura 12** sono riassunte le normali procedure per la sperimentazioni di una sostanza chimica in protocolli di cancerogenesi nella Comunità Europea.

Come tutti gli esperimenti tossicologici, gli effetti di un cancerogeno sono funzione della dose (o log. dose) (**figura 13**). La figura mostra chiaramente che per la maggior parte dei cancerogeni esiste una dose soglia (una dose cioè al di sotto della quale non si ha aumento dei tumori) e che la forma della risposta è la consueta sigmoide. La figura dimostra anche che la dose che porta ad aumento di tumori può variare in maniera importante, da sostanze molto potenti (e cioè che danno tumori a dosi di pochi ng/kg) ad altre che richiedono dosi elevate (mg/kg).

Queste informazioni sono molto importanti per l'estrapolazione dei dati di cancerogenesi animale a popolazioni umane. Tuttavia, sugli effetti di cancerogeni a basse dosi le opinioni non sono concordi. La maggior parte dei ricercatori ritiene però che esistano dosi soglia, dosi cioè al di sotto delle quali non si hanno effetti cancerogeni. Naturalmente la dose soglia può variare da una specie all'altra (ad esempio i roditori sono più suscettibili alla cancerogenesi da diossine policlorurate rispetto agli esseri umani). È quindi prudente considerare pericolosa qualunque concentrazione di cancerogeno ambientale, anche se inferiore alla soglia, perché i contaminanti cancerogeni sono molteplici e possono avere effetti additivi.

Figura 11

Dimensioni del campione richieste per ottenere differenze significative tra controlli e trattati

Frequenza di tumori spontanei nei controlli	Incremento di tumori atteso rispetto al controllo			
	70%	50%	30%	10%
10%	12	25	65	—
5%	10	18	35	464
1%	8	13	27	114

In grassetto il numero di animali necessari all'esperimento di cancerogenesi

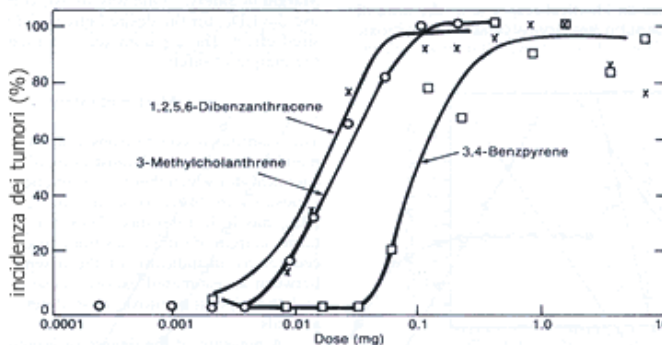
Figura 12

Protocollo di cancerogenesi relativo all'autorizzazione all'immissione sul mercato di un nuovo medicinale (CEE, 83)

- **Specie:** almeno due, se possibile con metabolismo simile all'umano, bassa incidenza tumori spontanei
- **Dosi:** via e frequenza di somministrazione simile a quella prevista per l'uomo. Frequenza giornaliera
- **Tre livelli di dose:** la massima dovrà dare un effetto tossico minimo, e la minima sarà il doppio o il triplo della dose terapeutica

Figura 13

Relazione dose-risposta per alcuni cancerogeni



Dal momento che la frequenza naturale dei tumori è bassa, per ottenere risultati in esperimenti di cancerogenesi con numeri accettabili di animali vengono usate dosi elevate rispetto all'esposizione umana, altrimenti sarebbe necessario sperimentare su popolazioni animali molto grandi (dell'ordine delle migliaia), con dispendio di energia, tempo ed elevati costi (**figura 14**).

Negli esperimenti di cancerogenesi è necessario controllare le condizioni ambientali e la dieta, che hanno effetti importanti sull'induzione di tumori sperimentali (**figura 15**).

Per rendere il costo degli esperimenti accettabile si usano popolazioni relativamente piccole di animali (intorno al centinaio) trattate con alte dosi di cancerogeno, in modo da ottenere in un tempo relativamente breve un'aumento considerevole della frequenza di tumori (fino al 100% degli animali sviluppano tumori). Questo modo di procedere è stato criticato, perché nella maggior parte delle esposizioni umane a cancerogeni (se si eccettua l'esposizione al fumo) la situazione normale è una esposizione a bassi livelli per lungo tempo; il problema è tuttavia difficilmente risolvibile.

In esperimenti di cancerogenesi, è necessario un controllo istologico di tutte le lesioni con apparenza macroscopica simil-tumorale (**figura 16**). I parametri che si prendono in considerazione sono il numero di animali con tumore, il numero di tumori per animale, la localizzazione dei tumori, le dimensioni del tumore, la latenza tra trattamento e comparsa del tumore.

Figura 14

Per stabilire se esistono effetti tossici o cancerogeni è necessario **usare dosi alte**. Per esempio, per vedere un effetto con la

- frequenza dello 0.01% (1 caso su 10000): in 50 milioni di abitanti, un effetto dello 0.01% equivale a: $50 \times 10^6 : X = 100 : 0.01$ dove $X = 5000$
- frequenza dello 0.01% in uno studio sperimentale dovremmo utilizzare per lo meno 30000 animali per vedere 3 animali con tumore

Figura 15

Altri aspetti pratici

- Età degli animali all'inizio dell'esperimento (>1 mese)
- Durata degli studi (> 6 mesi)
- Numero di animali per gruppo (50 maschi e 50 femmine per ogni dose e 50 per il controllo)
- Composizione della dieta (bilanciata)
- Gli animali vanno controllati quotidianamente per tutta la durata dell'esperimento

Figura 16

Indagini terminali: a conclusione dello studio tutti gli animali vengono sottoposti ad autopsia, saranno prelevati tutti gli organi e sottoposti ad indagine istologica

Una menzione a parte meritano i promotori (**figura 17**) sostanze che non sono cancerogene di per sé, ma che aumentano la potenza di un cancerogeno o inducono una più rapida comparsa dei tumori dopo esposizione ad un cancerogeno.

I promotori sono spesso sostanze ad effetto reversibile (ad esempio il catrame delle sigarette per la cancerogenesi delle vie respiratorie), che stimolano la riproduzione cellulare amplificando gli effetti dell'esposizione ad un cancerogeno. Alcuni classici promotori sono riportati nella **figura 18**.

Gli esperimenti a lungo termine consentono di studiare gli effetti di trattamenti preventivi nei quali si analizza la capacità di una variabile (ad esempio il trattamento con antiossidanti o con farmaci) di modificare la frequenza di induzione di tumori in un certo organo.

Come esempio di trattamenti di prevenzione riportiamo gli esperimenti del nostro laboratorio sull'effetto dei polifenoli sulla cancerogenesi del colon di animali trattati con il cancerogeno azossimetano (AOM). In questi esperimenti il cancerogeno (7.4 mg/kg alla settimana per quattro settimane) è somministrato nella prima fase dell'esperimento ed i supposti agenti preventivi nelle fasi successive. Dopo sedici settimane di trattamenti quotidiani con gli agenti dal supposto effetto antitumorale (polifenoli), si misura la frequenza dei tumori del colon degli animali trattati o non con il supposto agente preventivo, in questo caso una miscelazione di polifenoli (**figura 19**).

Figura 17

Promozione: non richiede mutazioni, ma una espansione numerica delle cellule che hanno subito mutazioni

Esistono delle sostanze chimiche (Promotori) che pur non essendo mutagene inducono la formazione di tumori

Figura 18

Struttura chimica di alcuni promotori

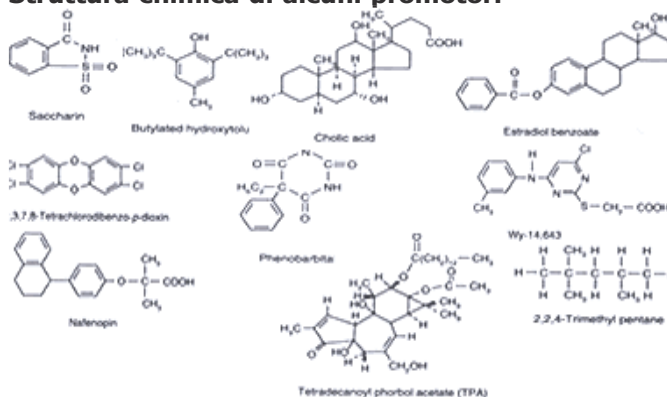


Figura 19

Effetto di estratti polifenolici sulla cancerogenesi intestinale di ratto

durata del trattamento: 10 settimane	latenza: 16 settimane
AOM (7.4 mg/kg x 10)	Controls
AOM (7.4 mg/kg x 10)	Black tea extract
AOM (7.4 mg/kg x 10)	Green tea extract
AOM (7.4 mg/kg x 10)	Wine extract

I risultati dimostrano che alcuni polifenoli possono ridurre il numero di tumori nel colon degli animali trattati (figura 20).

I test di cancerogenesi a lungo termine hanno il difetto di richiedere tempi sperimentali lunghi e di essere costosi. Esistono per alcuni organi (come il colon) altri test di cancerogenesi, detti a breve termine, perché richiedono sperimentazioni della durata di settimane e non di mesi o anni. I processi di cancerogenesi sono, infatti, lenti e preceduti da lesioni pre-cancerose, come schematizzato nella figura 21, che illustra il processo di cancerogenesi del colon dell'uomo. La maggior parte dei tumori richiedono periodi molto lunghi per formarsi e per dare ripetizioni a distanza (figura 22). Infatti, la probabilità di sviluppare tumori ha una forte correlazione con l'età. In alcuni soggetti si ha l'induzione di tumori ad età più giovane, per una maggiore suscettibilità ai cancerogeni (ad esempio per un deficit di riparo del DNA) o, a parità di suscettibilità, per esposizione a dosi più alte di cancerogeni (figura 23). Un trattamento preventivo può rallentare o ridurre l'incidenza del cancro.

I test a breve termine possono consentire di studiare i fenomeni di progressione tumorale dal loro inizio. Ad esempio è possibile evidenziare precocemente nel colon di animali trattati con cancerogeni foci di cripte aberranti (ACF) (figura 24), o foci senza mucine (MDF) (figura 25).

Figura 20
Numero di tumori/ratto in animali trattati con AOM e quindi con estratti polifenolici

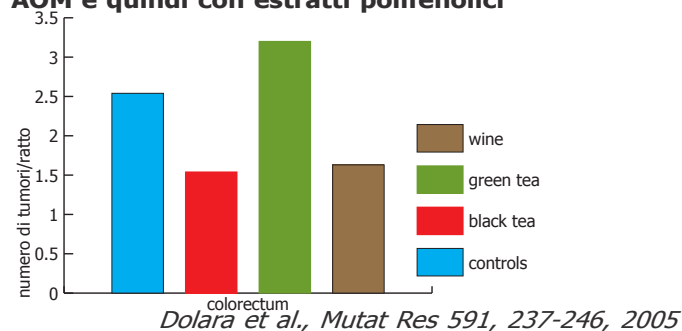


Figura 21
Sviluppo progressivo del cancro del colon

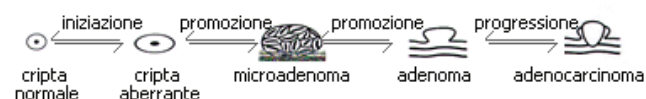


Figura 22
Schema generale di sviluppo multi-step di un tumore (polmonare)



Figura 23
Il rischio di sviluppare tumore è progressivo con l'età

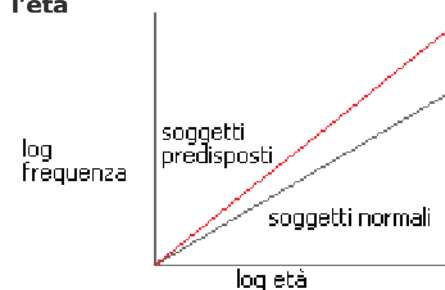


Figura 24
Esempio di lesioni precoci in un organo (colon): ACF (foci di cripte aberranti, ingrandimento 40x)

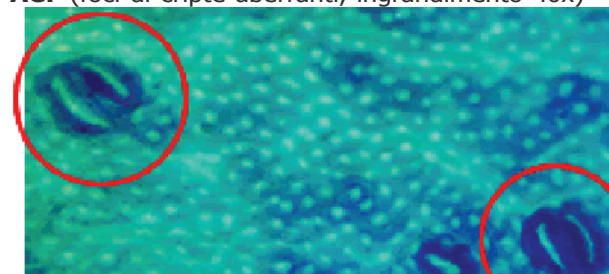
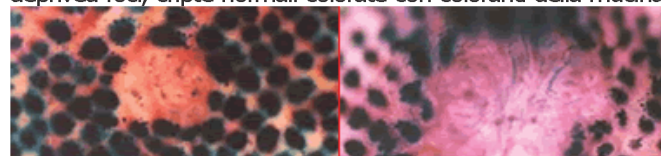


Figura 25
Altre lesioni preneoplastiche del colon, MDF (Mucin deprived foci, cripte normali colorate con coloranti della mucina)



Queste lesioni sono provocate in modo dose-dipendente da un cancerogeno (figura 26), o da cancerogeni presenti negli alimenti come le ammine eterocicliche (IQ e me-IQ, figura 27).

Come mostra la figura 28, in questo modello di studio delle lesioni precoci del colon (MDF), un trattamento con acido colico (un promotore che porta a morte cellulare nella mucosa del colon e stimola in conseguenza la proliferazione delle cellule residue) aumenta il numero delle lesioni pre-neoplastiche (e di tumori). Al contrario gli anti-infiammatori non steroidei (NSAID), come il piroxicam (che riducono infiammazione, uno dei meccanismi che stimola la cancerogenesi) possono ridurre la formazione di lesioni pre-neoplastiche (ed infatti inibiscono anche i tumori, come l'aspirina a basse dosi). Con questi metodi è quindi possibile studiare l'effetto di trattamenti preventivi con trattamenti di relativamente breve durata e costo, i cui risultati possono poi essere utilizzati in trial clinici.

Figura 26

Induzione di foci di cripte aberranti (ACF) da dimetilidrazina (DMH) nel ratto

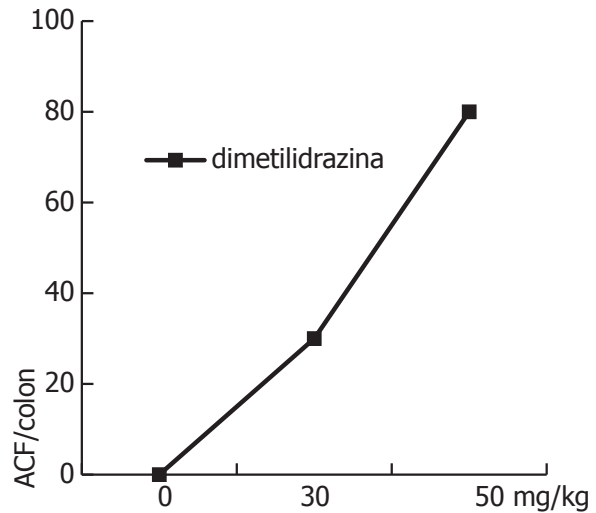


Figura 27

Induzione di ACF da parte di alcuni cancerogeni alimentari

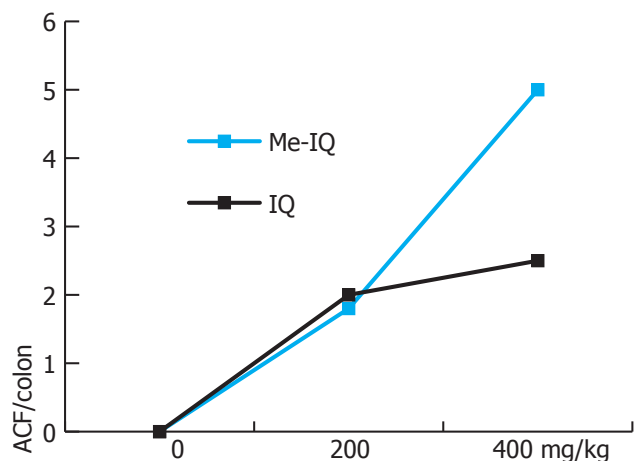
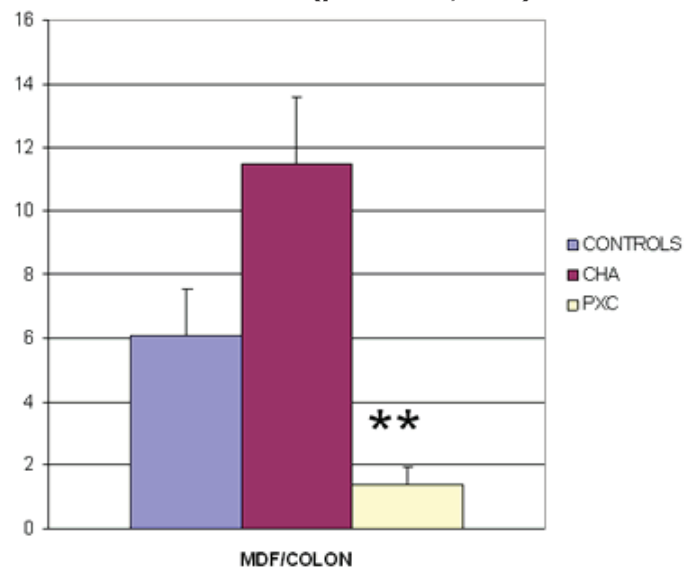


Figura 28

Variazione degli MDF dopo trattamento con un promotore (acido colico, CHA) o un antinfiammatorio non steroideo (piroxicam, PXC)



rox

lezione n. 8

Teratogenesi

La teratogenesi (dal termine greco Τεραζ= mostro), è quella parte della tossicologia che si occupa dell'effetto delle sostanze tossiche sullo sviluppo dell'embrione. Questa materia è regolata dalla direttiva CEE 75/318 (per quanto riguarda i farmaci) e dalle linee guida di varie organizzazioni nazionali (EPA) ed internazionali (OECD).

Il numero di nati morti in Italia è ormai ai limiti minimi della specie (**figura 1**) ed è poco probabile che possa essere ulteriormente diminuito (se si eccettuano gli aborti provocati).

Il periodo più critico dello sviluppo fetale è quello dalla 1.a alla 8.a settimana (**figura 2**). Anomalie dello sviluppo si possono tuttavia verificare dopo la 9 settimana (**figura 3**). Le malformazioni nei mammiferi sono variabili a secondo delle specie e a seconda delle razze. Alcune specie e razze di mammiferi hanno malformazioni molto frequenti (**figura 4**).

Figura 1

Rilevamento dei difetti congeniti in Toscana (1980-96):

- nati vivi 88%
- nati morti 2.6%
- aborti spontanei 0.4%
- aborti provocati 8.1%

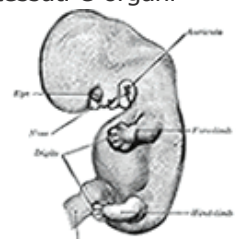
Figura 2

Finestre temporali critiche di esposizione umana: alterazioni nella fase di embriogenesi (dalla 1^a all'8^a settimana di gravidanza)

- Aborto spontaneo
- Difetti morfologici in specifici tessuti e organi



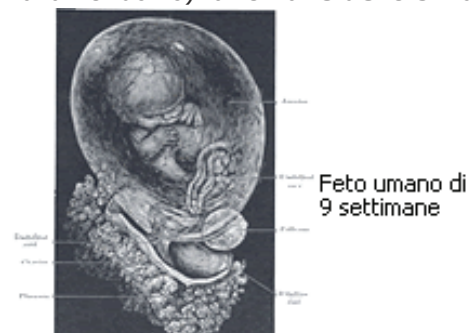
Embrione umano tra la quarta e la quinta settimana



Embrione umano di 6 settimane

Figura 3

Fase di accrescimento fetale (dalla 9^a alla 20^a settimana nell'uomo): anomalie dello sviluppo



Feto umano di 9 settimane

Figura 4

Malformazioni spontanee nei mammiferi (x 1000 nati):

- topo 1-18
- ratto 0.02-1.9
- coniglio 0.7-6.3
- cane 0.2-1.9
- pecora 1.8-9.1
- mucca 0.2-3

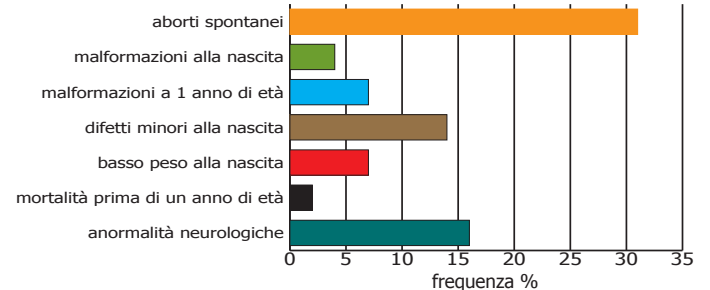
La frequenza di malformazioni umane viene tenuta sotto controllo da organizzazioni internazionali (figura 5) ed è considerevolmente elevata (figura 6). Nonostante che la maggioranza di queste malformazioni sia legata a malattie genetiche, molte sono ancora dovute a cause ignote (figura 7). La figura 8 e 9 riportano le più comuni malformazioni gravi umane. Alcune di queste, come l'ipospadia, sono aumentate in Europa negli ultimi anni. Le cause di questi aumenti non sono note, ma è stata sollevata la possibilità che la causa sia correlata all'aumento degli estrogeni ambientali (figura 10).

Figura 5

- International Centre on Birth Defects, URL <http://www.icbd.org>
- European Registration of Congenital Anomalies and Twins, URL <http://www.eurocat.ulster.ac.uk>

Figura 6

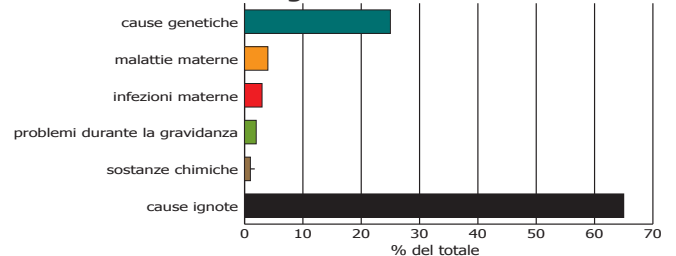
Frequenza di gestazioni con problemi fetali in Europa



Rielaborato da dati della European Registration of Congenital Anomalies and Twins, <http://www.eurocat.ulster.ac.uk>

Figura 7

Cause di difetti della gestazione umana



Idem

Figura 8

Comuni malformazioni



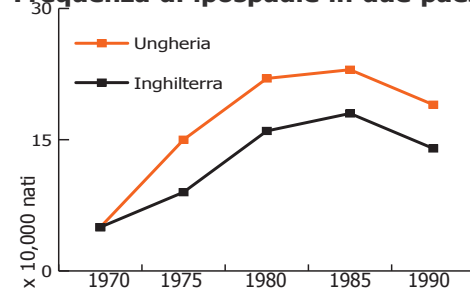
Figura 9

Comuni malformazioni



Figura 10

Frequenza di ipospadie in due paesi europei



Topari et al., Hum. Reprod. Update 7, 282-286, 2001

La **figura 11** analizza le più importanti malformazioni in Toscana. Le più frequenti sono a carico dell'apparato cardiovascolare, degli arti, e dell'apparato urogenitale. Le malformazioni variano poco da provincia a provincia; in Toscana e curiosamente sono più alte che in altre regioni italiane (**figura 12**), in particolare sono frequenti in Toscana le alterazioni cardiovascolari (**figura 13**).

Lo studio degli effetti teratogeni è obbligatorio per i farmaci e viene condotto su almeno due specie, di cui una di non roditori. Si preferiscono animali in cui il profilo farmacocinetico è simile a quello umano. In caso di dubbio si utilizza una terza specie. Di solito per questi studi si utilizzano almeno 20 femmine gravide (per i roditori) e 12 per i non roditori. Gli studi di teratogenesi si fanno somministrando la sostanza in esame a vari tempi della gravidanza di ogni specie (uno iniziale, uno intermedio ed uno a termine). Metà delle femmine vengono sacrificate prima del parto per contare il numero di feti ed evidenziare eventuali malformazioni. Uno dei metodi usati per evidenziare effetti teratogeni è di misurare nell'ovaia il numero di corpi lutei (cioè di ovuli maturati) relativo al numero di impianti (feti impiantati nell'utero; le gravidanze sono multiple nei roditori). Questo dà la misura immediata della frequenza percentuale di aborti precoci. Se il numero dei feti impiantati è più basso del numero dei corpi lutei ciò significa che i feti sono morti nell'utero materno per effetti tossicologici. Si misurano poi il peso, la frequenza dei due sessi, lo scheletro e gli organi principali dei feti a termine. Le dosi di

Figura 11

Malformazioni in Toscana (prevalenza x 1000 nati)

- Cardiovascolari 8.4
- Arti 3.8
- Urogenitale 2.7
- Cromosomi 2.7
- Muscoloschel. 1.8
- Nervoso 1.5
- Digerente 1.2
- Tegumenti 1.1
- Genitali 1.1
- Palato-labbro 1.0
- Orecchio 0.4
- Occhio 0.4
- Metabolismo 0.2
- Respiratorio 0.2

Registro Toscano difetti congeniti <http://www.rtdc.it/>

Figura 12

Prevalenza dei difetti congeniti nelle province toscane

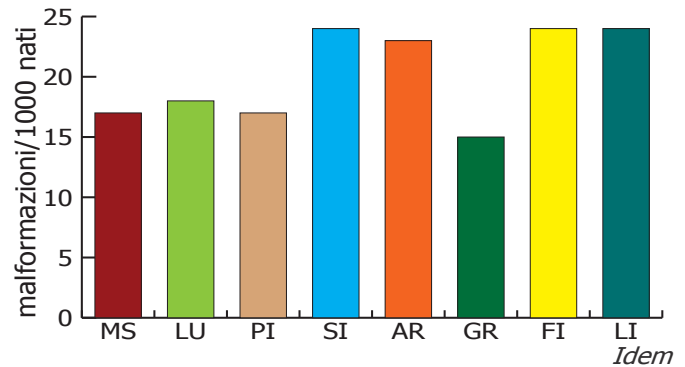
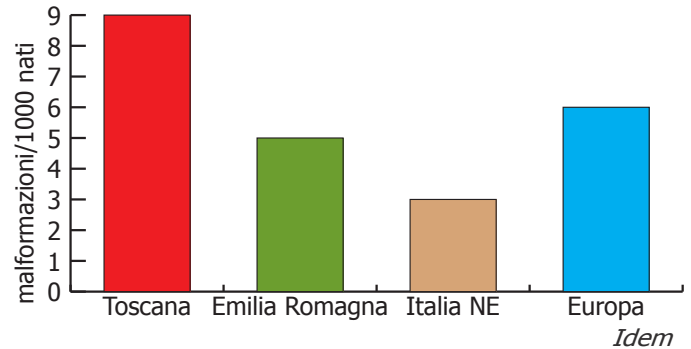


Figura 13

Prevalenza dei difetti cardiovascolari in Italia ed Europa



questi esperimenti devono essere scelte in modo da provocare qualche effetto tossico, compatibile però con il proseguimento della gravidanza (**figura 14**). Le dosi, in caso di un contaminante ambientale, possono essere calcolate sulla base dei livelli teorici raggiungibili in seguito ad una presunta esposizione.

Ogni specie ha una finestra temporale diversa di sensibilità ai teratogeni, in funzione del momento diverso di sviluppo degli organi nelle varie specie, che è riassunto nella **figura 14**.

Un esempio di questa regola è riportato nella **figura 15**, che descrive i diversi effetti teratogeno di un retinoide in funzione del momento di somministrazione. I retinoidi sono importanti farmaci con effetti teratogeni (**figura 16**). I retinoidi sono usati nella terapia dell'acne grave, ma provocano, oltre all'effetto teratogeno, importanti effetti collaterali (depressione, suicidio, aumento della coagulazione, iperlipidemia). I retinoidi hanno effetti sulla regolazione della funzione genica (**figura 17**) e rimodellano la struttura della pelle. Se somministrati in gravidanza provocano gravi difetti del tubo neurale nel feto.

Figura 14
Successione temporale della maturazione del feto dei mammiferi (giorni)

	ratto	coniglio	scimmia	donna
Organogenesi	6-17	6-18	20-25	21-56
Formazione degli arti	11	11	25	29-30
Chiusura del cuore	15			46
Chiusura del palato	16	20	45	56
Durata della gestazione	22	32	165	267

Figura 15
Esempio di dipendenza agli effetti teratogeni (tipo e frequenza di malformazioni) in funzione del periodo di esposizione a un retinoide durante la gestazione (hamster)

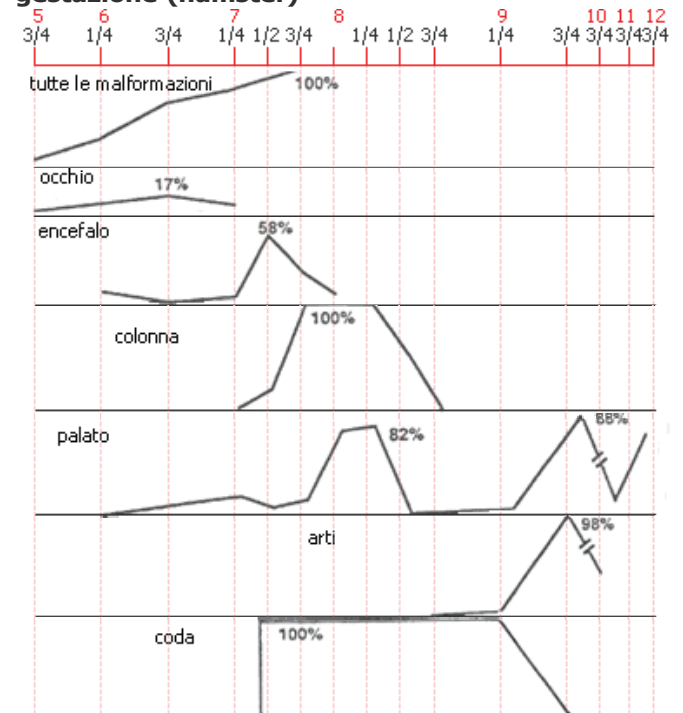


Figura 16
Retinoidi di III generazione:

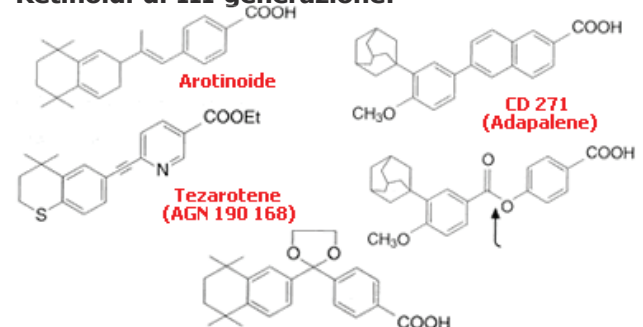
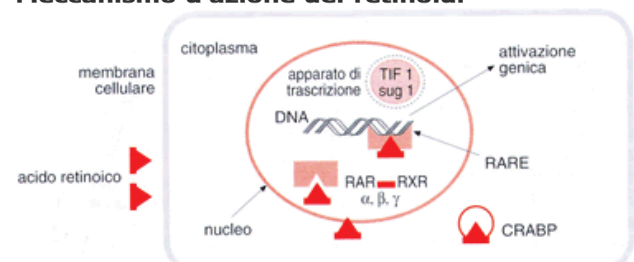


Figura 17
Meccanismo d'azione dei retinoidi



Gli effetti teratogeni devono essere sperimentati in specie diverse, perché non si ha sempre concordanza tra gli effetti negli animali da esperimento e gli effetti umani. Ad esempio il dicumarolo è scarsamente teratogeno negli altri mammiferi (**figura 18**), gli androgeni sono invece teratogeni in tutti i mammiferi (**figura 19**).

Il dietilstilbestrolo (DES) è teratogeno nell'uomo, nel topo, nel ratto e in alcune scimmie, ma non in alcuni mammiferi (**figura 20**). Il DES è stato usato negli anni '50 (soprattutto negli USA) per ridurre il rischio di parto precoce, con il risultato di indurre una grave alterazione cellulare nei genitali femminili responsabile della induzione di un raro tumore, il carcinoma vaginale delle giovanette (**figura 21**).

La Streptomina provoca alterazioni dell'VIII nervo nel ratto e nell'uomo (**figura 22**) e il metilmercurio alterazioni del sistema nervoso centrale nell'uomo, nel topo e nel ratto (**figura 23**) e fu responsabile di un elevato numero di malformazioni nell'incidente di Minamata in Giappone negli anni '60, dovuto alla contaminazione del mare da mercurio provocato da una industria chimica (**figura 24**). Oltre alle malformazioni il metilmercurio provoca negli adulti grave tossicità a livello del sistema nervoso centrale (atassia, parestesie, alterazioni del campo visivo).

Figura 18

Teratogenesi da dicumarolo

uomo	topo	ratto	coniglio	cane	maiale	scimmia
Anticoagulanti cumarinici difetti scheletrici	—	—	—	?	—	—

X = stesse malformazioni; **+** = altre malformazioni

— = non malformazioni; **?** = non testato

Da Schardein, Chemically Induced Birth Defects, Marcel Dekker Ed., 1985, pag. 87-105

Figura 19

Teratogenesi da androgeni

uomo	topo	ratto	coniglio	cane	maiale	scimmia
Androgeni (pseudoermafroditismo)	X	X	X	X	X	X

X = stesse malformazioni; **+** = altre malformazioni

— = non malformazioni; **?** = non testato

Idem 261-269

Figura 20

Teratogenesi da DES

uomo	topo	ratto	coniglio	cane	maiale	scimmia
Dietilstilbestrolo (lesioni uterovaginali)	X	X	—	—	?	+/-

X = stesse malformazioni; **+** = altre malformazioni

— = non malformazioni; **?** = non testato

Idem 272-274

Figura 21

Teratogenesi da Dietilstilbestrolo (DES)



Carcinoma a cellule chiare della vagina



Figura 22

Teratogenesi da streptomina

uomo	topo	ratto	coniglio	cane	maiale	scimmia
Streptomina (VIII nervo sordità congenita)	—	X	—	?	?	?

X = stesse malformazioni; **+** = altre malformazioni

— = non malformazioni; **?** = non testato

Idem 368-402

Figura 23**Teratogenesi da metlmercurio**

uomo	topo	ratto	coniglio	cane	maiale	scimmia
Metlmercurio microcefalia e deficit neurologici	+	+/-	X	-	-	-

X = stesse malformazioni; + = altre malformazioni

- = non malformazioni; ? = non testato

Da Schardein, Chemically Induced Birth Defects, Marcel Dekker Ed., 1985, pag. 261-269

Figura 24**Teratogenesi da Hg: Minamata****Figura 25****Teratogenesi da talidomide**

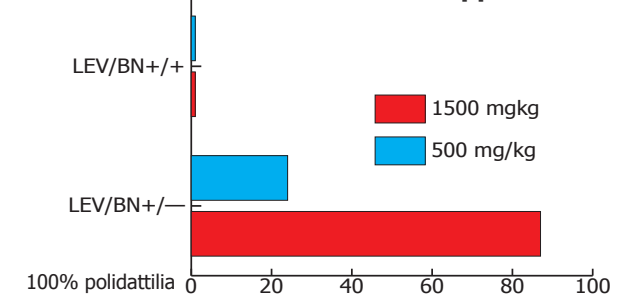
uomo	topo	ratto	coniglio	cane	maiale	scimmia
Talidomide Focomelia	+	+/-	X	+	+	X

X = stesse malformazioni; + = altre malformazioni

- = non malformazioni; ? = non testato

Idem 31-33

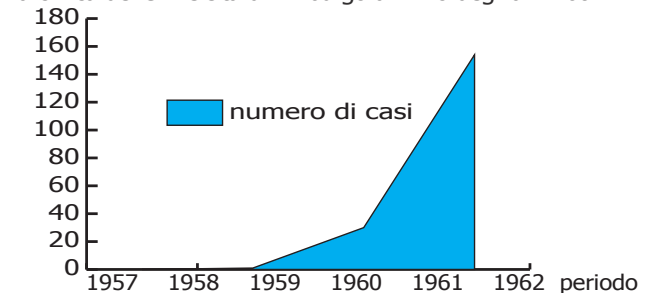
Un caso sfortunato di teratogenesi da farmaci è stato quello della talidomide, che è teratogeno nel coniglio, nell'uomo e nella scimmia (figura 25). Purtroppo negli anni '50 la talidomide fu sperimentata solo in un tipo di ratti, resistente all'effetto teratogeno (figura 26); la talomide fu usata con effetti disastrosi per trattare disturbi del sonno in gravidanza provocando in Europa una vera epidemia di malformazioni (figura 27).

Figura 26**Effetto della talidomide su due ceppi di ratto**

Rielaborato da dati di Bila e Kren, Folia Biol. 40, 161-171, 1994

Figura 27

Il disastro della talidomide: casi di focomelia registrati presso la clinica dell'Università di Amburgo all'inizio degli anni '60



Nel 1956 immessa in commercio come ipnotico-sedativo (dosi 50-200 mg/die), **alla fine 1961** viene ritirata, **5850 casi stimati nel mondo**

La focomelia (mancato sviluppo degli arti superiori) era la malformazione più frequente nei figli delle madri che avevano assunto talidomide (figura 28). La talidomide è tossica per lo sviluppo di organi diversi in funzione del periodo di somministrazione (figura 29).

Il meccanismo degli effetti teratogeni della talidomide è ancora oscuro, ma è possibile che gli effetti sono legati al blocco dell'angiogenesi, o forse, di alcune funzioni cellulari (blocco della maturazione linfocitaria)

Un caso particolare di teratogenesi sono gli antineoplastici. In linea generale il loro uso è controindicato in gravidanza e la presenza di una neoplasia maligna è sufficiente ad iniziare, su richiesta della madre, un aborto terapeutico. Tuttavia sono segnalati casi di malformazioni dovute all'uso di antineoplastici, volontario o accidentale, nonostante la controindicazione all'uso in gravidanza (figura 30).

Tra i farmaci di comune uso, gli antiepilettici hanno un effetto teratogeno (figura 31). Purtroppo spesso non possono essere interrotti in gravidanza.

I metodi per lo studio dell'attività teratogenica delle sostanze chimiche sono imprecisi, ma possono fornire importanti informazioni, perché utilizzino più specie di mammiferi. Per questo motivo sono costosi e contestati dagli animalisti.

Recentemente sono stati proposti metodi alternativi che invece di animali gravidi utilizzano cellule staminali embrionali o embrioni coltivati in vitro (figura 32). In alternativa è stato proposto da organismi scientifici internazionali di utilizzare protocolli classici, ma con un numero inferiore d'animali.

Figura 28
Talidomide

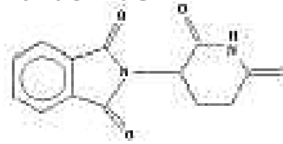


Figura 29
Periodi critici per le malformazioni da talidomide (donna)

giorni di gestazione	tipologia di malformazione
21-22	Paralisi nervi cranici
24-27	Focomelia (braccia)
28-29	Focomelia (gambe)
34-36	Ipoplasia dei pollici
	Stenosi anorettale

Figura 30

Chemioterapici antitumorali. Effetti teratogeni:

- Metotrexato: alterazioni del cranio (fontanelle patologiche, sinostosi)
- Ciclofosfamide: palatoschisi, difetti oculari e scheletrici

Figura 32

Antiepilettici (AED). Aumento del rischio relativo (RR) di anomalie congenite nelle madri epilettiche:

- 2-3 volte con un tipo di AED
- 5 volte con 2 tipi di AED
- 10 volte con 3 tipi di AED
- 20 volte con 4 tipi di AED

Zahn et al., Neurology. 51, 949-951, 1998

Anche le crisi epilettiche durante il primo trimestre sono associate a un aumento del rischio di malformazioni (3 volte rispetto a madri trattate con AED che non avevano avuto episodi di convulsioni)

Lindhout et al., Neurology 42, 92-110, 1992

Figura 32

Metodi alternativi alla sperimentazione animale: ECVAM (European Center for the Validation of Alternative Methods) **EMBRYOTOXICITY TESTING IN POSTIMPLANTATION RAT WHOLE — EMBRYO CULTURE — METHOD OF PIERSMA**

Isolamento in cultura di embrioni di ratto agli stadi precoci della organogenesi e studio in vitro degli effetti teratogeni

- morfologia, malformazioni specifiche
- funzionalità (cardiaca e circolatoria)
- crescita dell'embrione in vitro

rox

lezione n. 9

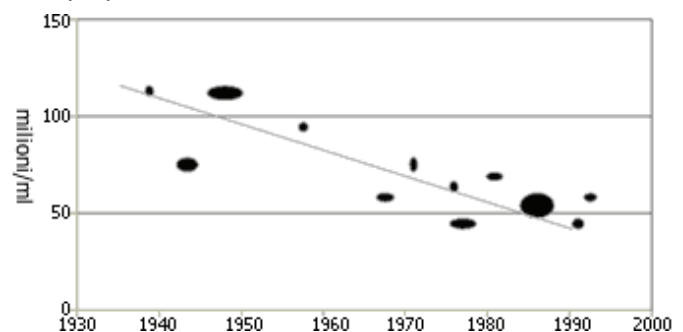
Tossicità riproduttiva di farmaci e tossici

La tossicità riproduttiva è un'importante aspetto della tossicità dei farmaci e delle sostanze chimiche. Infatti la riproduzione è un processo delicato, che può essere facilmente alterato da esposizione a sostanze tossiche. Per i farmaci la materia è regolata dalla direttiva CEE 75/318 e per le sostanze tossiche da varie disposizioni di organizzazioni nazionali (per gli USA dalla EPA) e internazionali (Organization for Economic Development, OECD).

Il problema che è stato segnalato negli ultimi settant'anni è la riduzione della fertilità maschile nelle popolazioni umane. Questa conclusione è contestata da alcuni endocrinologi, che ritengono il fenomeno un effetto di variazioni d'abitudini (ad esempio lo sposarsi ed avere figli tardi) e di una maggiore medicalizzazione, per effetto della quale persone con problemi riproduttivi si rivolgono ai medici più di quanto non facessero un tempo. Con questa riserva, studi internazionali controllati in varie parti del mondo indicano (**figura 1**), che esiste un trend negativo nella concentrazione di spermatozoi per eiaculato. La riduzione della conta degli spermatozoi è accompagnata ad un aumento di cancro testicolare (**figura 2**). È possibile che i due fenomeni siano correlati, perché gli oligospermici sono a maggior rischio di cancro testicolare dei normospermici; alcuni autori hanno avanzato l'ipotesi che questi effetti possano essere dovuti agli estrogeni ambientali.

Figura 1.

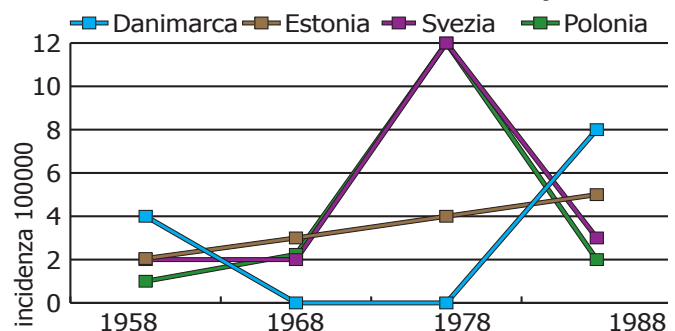
Variazioni della densità spermatica media umana (63 pubblicazioni dal 1938 al 1990). Interpolazione dei dati con un modello lineare. Le dimensioni dei cerchi sono proporzionali alle dimensioni dello studio



Swan et al., Environm Health Persp 105, 1228-1230, 1997, modificato

Figura 2.

Variazione del cancro testicolare in Europa



Gli studi di fertilità sperimentali sono ancora condotti con metodiche di tossicologia classica, relativamente semplici, che consistono nel trattamento di un numero adeguato di animali di ambi i sessi (di solito si usano gruppi di 24 animali di ogni sesso) con dosi scalari di una sostanza prima e dopo l'accoppiamento. In caso di inibizione della fertilità, per chiarire se gli effetti sono sul maschio o sulla femmina, l'esperimento viene ripetuto trattando in maniera differenziale ciascuno dei due sessi.

Gli effetti di un tossico riproduttivo possono esercitarsi sui gameti maschili, femminili o sul feto. I gameti maschili vengono prodotti dai tubuli seminiferi dei testicoli, nel centro dei quali si raccolgono i gameti maturi (spermatozoi) (figura 3). Le alterazioni più comuni della funzione testicolare sono caratterizzate da diminuzione di peso o alterazioni morfologiche dei testicoli, o riduzione del numero e della vitalità degli spermatozoi, spesso come conseguenza o in associazione a alterazioni ormonali (per esempio come conseguenza della esposizione a estrogeni ambientali o alimentari).

L'uomo (che può accoppiarsi con ogni femmina recettiva una volta al mese — le femmine umane non presentano l'estro annuale caratteristico della maggior parte dei mammiferi) non è un gran produttore di spermatozoi, dal punto di vista del numero di spermatozoi per testicolo (figura 4) o della produzione giornaliera (figura 5). Gli spermatozoi sono protetti funzionalmente, dalla selezione "dei migliori" e dagli alti livelli di antiossidanti nel liquido testicolare (figura 6). Per quanto riguarda le cellule uovo sono protette dallo strato di cellule circostanti (la granulosa),

Figura 3

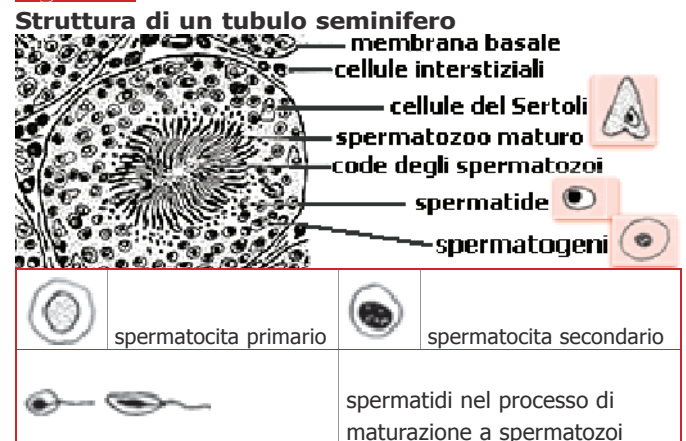


Figura 4

Numero di spermatozoi per testicolo (milioni per grammo)

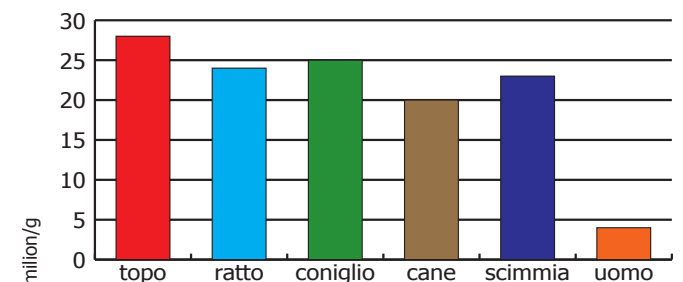


Figura 5

Numero di spermatozoi giornalieri totali per maschio (milioni)

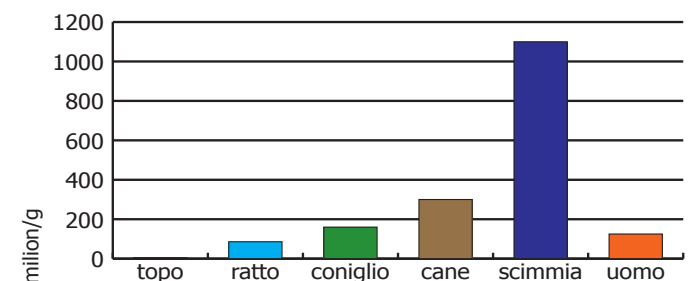


Figura 6

Fattori di protezione spermatici

- semplicità della struttura citoplasmatica
- alto livello spermatico di antiossidanti
- numero elevato di spermatozoi prodotti
- apoptosi delle cellule danneggiate
- selezione delle cellule mobili
- competizione

che hanno funzione di metabolizzare ed in alcuni casi di detossicare gli xenobiotici (**figura 7**); gli ovuli sono inoltre in condizioni relativamente protette, in quanto cellule quiescenti (riduzione dello stress ossidativo). Inoltre gli oociti danneggiati vanno incontro a morte controllata, o apoptosi, che può essere aumentata o ridotta artificialmente in laboratorio trasferendo in oociti mitocondri in varie condizioni di vitalità; per esempio l'apoptosi può essere bloccata iniettando in una cellula uovo mitocondri indenni di un'altra cellula (**figura 8**).

Una femmina umana nasce con circa un milione di cellule uovo, ma solo circa 500 arrivano a maturazione e possono essere fecondate.

Come dimostra la **figura 9** la popolazione umana del mondo è ancora abbondante. Tuttavia la preservazione della fertilità è un impegno per il futuro, e un aiuto per tutto le coppie che fanno fatica a procreare.

Le sostanze chimiche che provocano tossicità riproduttiva nel maschio sono molteplici; tra questi importanti sono alcuni pesticidi (ad esempio l'etilendibromuro, fumigante antifungino), il Pb, l'esano, l'ossido di etilene (usato per sterilizzare materiale medico), il cloruro di vinile (importante prodotto chimico usato nella produzione del PVC) l'acrilamide, il disolfuro di carbonio. Tra i farmaci e le sostanze d'abuso importanti sono l'acido valproico (antiepilettico), l'amiodarone (antiaritmico) e l'etanolo (**figura 10**). L'etanolo in dose eccessiva provoca insufficienza epatica, ginecomastia, impotenza e sterilità per riduzione della sintesi ed aumentata degradazione degli androgeni a livello epatico. L'alcol è anche teratogeno in quasi tutti i

Figura 7

Struttura dell'ovaio

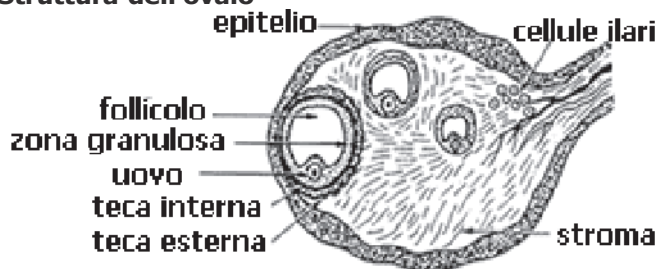
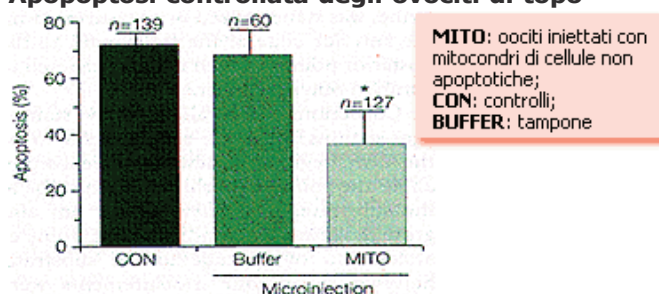


Figura 8

Apoptosi controllata degli oociti di topo



Perets et al., Nature 403, 500-501, 2000

Figura 9

Proiezione delle variazioni della popolazione mondiale nel XXI secolo

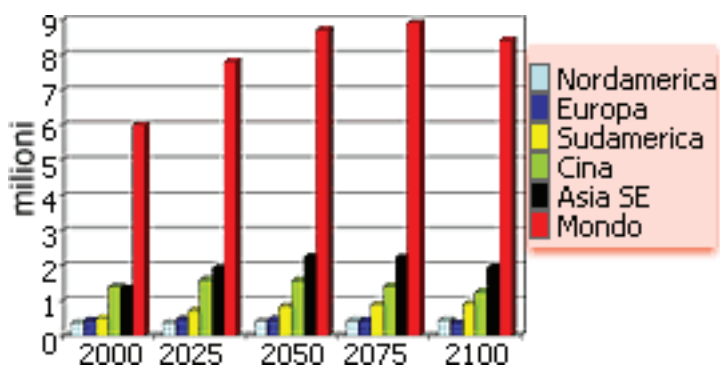


Figura 10

Effetti dell'alcol sulla sessualità umana: **è l'alcol un afrodisiaco?** L'opinione di Shakespeare (Macbeth) McDuff: *what three things does drink especially provoke?*

Porter: *Marry, sir, nose painting, sleep and urine.* Lechery sir, *it provokes and unprovokes. It promotes the desire, but takes away the performance*

mammiferi (**figura 11**). Se assunto in gravidanza ad alte dosi l'etanolo provoca la "sindrome alcolica fetale" caratterizzata da gravi deficit nervosi ed intellettivi (IQ < 70) e danni irreversibili al SNC. I soggetti affetti da questa forma hanno caratteristiche craniofacciali particolari (**figura 12**), associate ad alterazioni anatomiche del SNC, con riduzione di spessore della corteccia cerebrale e dei nuclei della base (**figura 13**).

Un'altra sostanza di abuso che provoca importante danno fetale è la cocaina (**figura 14**).

Al di là dell'abuso di alcol della madre, l'abuso di droghe (cocaina e morfina), le carenze nutrizionali vitaminiche, l'anemia grave, il diabete ed alcune infezioni (sifilide) possono portare a danno fetale, direttamente o attraverso il danno placentare. Il danno placentare è un comune meccanismo di tossicità associato ad alterazioni fetali (**figura 15**).

Le sostanze che provocano tossicità riproduttiva nella femmina sono numerose. Tra queste le ammine aromatiche, l'ossido di etilene, i glicoeateri, la formalina (esposizione professionale delle infermiere o dei tecnici di laboratorio medico), il metilmercurio, gli ftalati (esposizione professionale nell'industria tessile), il Pb, gli erbicidi, lo stirene e lo stirene ossido (industria chimica), i solventi organici (toluene, benzene), il cloruro di vinile monomero, i policlorobifenili (PCB). Tra i farmaci ricordiamo gli steroidi, gli antineoplastici, gli anoressizzanti, gli IMAO, gli antiblastici, gli oppioidi. Tra le sostanze varie il fumo di sigaretta, le carenze nutrizionali gravi e l'etanolo.

Figura 11

Teratogenesi da etanolo. Effetti su

- uomo: ritardo mentale, difetti craniofacciali e della crescita degli arti
- topo (stesse malformazioni)
- ratto (altre malformazioni)
- cane (stesse malformazioni)
- maiale (altre malformazioni)
- scimmia (non testata)

Schardein, Chemically Induced Birth Defects, Marcel Dekker Ed., 1985

Figura 12

Difetti facciali nella sindrome fetoalcolica

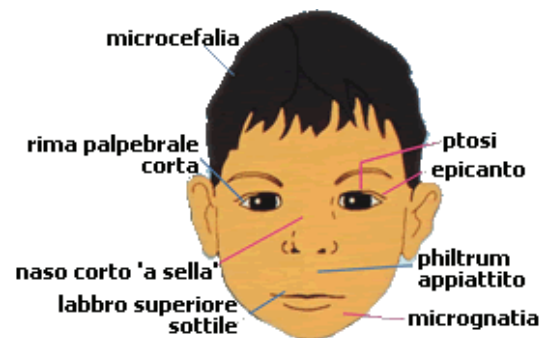
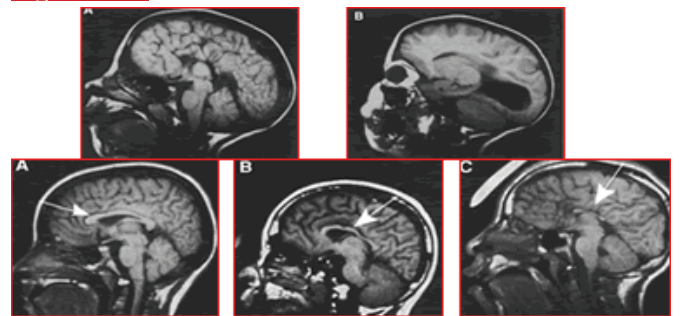


Figura 13



Maier et al., Alcohol Clin Exp Res 21, 1418-1428, 1997

Figura 14

Cocaina

- parto prematuro
- microcefalia
- ridotto peso alla nascita
- problemi neurologici
- morte improvvisa neonatale
- effetti sul feto e sulla funzione placentare

Figura 15

Esempi di tossici della placenta:

- cadmio (induzione di una metallotioneina che sequestra Zn)
- arsenico
- mercurio
- fumo di sigaretta
- alcool
- cocaina

Conseguenze:

- ridotto flusso sanguigno alla placenta
- necrosi del tessuto placentare
- inibizione del trasporto placentare di nutrienti

rox

lezione n. 10

Danni cellulari da radicali liberi

I radicali liberi sono molecole estremamente reattive con breve emivita, che possono alterare il funzionamento delle cellule. Hanno un elettrone spaiato negli orbitali esterni (**figura 1**). Spesso i radicali liberi si formano come prodotti metabolici di sostanze esogene con un meccanismo di tossificazione (**figura 2**); i radicali liberi sono spesso chiamati forme reattive dell'ossigeno o ROS (**figura 3**).

L'acqua ossigenata è un comune precursore dell'ossigeno radicalico (**figura 3**). Nelle cellule sono spesso presenti quantità catalitiche di metalli, alcuni dei quali (ferro e rame) catalizzano la cosiddetta reazione di Fenton, che porta alla formazione di una comune specie radicalica, l' OH^\bullet (**figura 4**). L'ossigeno singoletto si forma anche durante normali reazioni di ossidazione intracellulare: ad esempio, le ossidasi flaviniche producono ossigeno singoletto nel corso del metabolismo di composti xenobiotici (**figura 5**).

Figura 1

Radicali liberi: R^\bullet



Caratteristiche:

- elevata instabilità, breve emivita
- elevata reattività
- presenza di un elettrone spaiato in un orbitale esterno

Figura 2

Sono un esempio di tossificazione:

la sostanza lesiva (radicale) è generata all'interno dell'organismo a partire da un precursore non tossico

detossificazione:

modificazione chimica del tossico e riduzione della sua reattività

Figura 3

Metaboliti reattivi dell'ossigeno

ROS, Reactive Oxygen Species

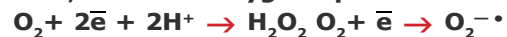


Figura 4

Produzione di OH^\bullet con la reazione di FENTON

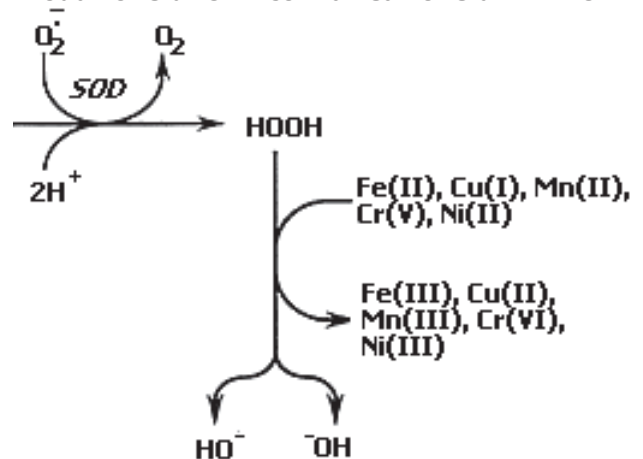


Figura 5

Produzione di $\text{O}_2^{\bullet -}$ da parte di ossidasi flaviniche



Anche il citocromo P450 può formare specie radicaliche. Alcuni esempi di formazione di radicali nel corso del metabolismo sono l'ossidazione del paraquat, della doxorubicina e della nitrofurantoina da parte del P-450 (**figura 6**). Il paraquat ed il diquat sono erbicidi che possono provocare con questo meccanismo tossicità polmonare (**figura 7**).

La doxorubicina è un agente antineoplastico che può dare insufficienza cardiaca (**figura 8**). L'attivazione della doxorubicina avviene soprattutto a livello dei mitocondri cardiaci e ciò spiega la selettività dell'azione (**figura 9**). Anche la tossicità della nitrofurantoina e del paraquat è basata su questo meccanismo. In questo caso l'organo bersaglio è il polmone (**figura 10**).

Figura 6
Produzione di superossido dal P-450 da paraquat (PQ), doxorubicina (DR) e nitrofurantoina (NF)

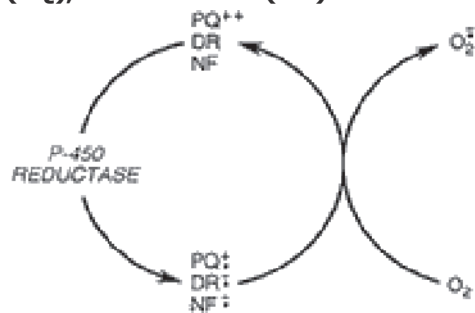


Figura 7
Erbicidi bipiridinici

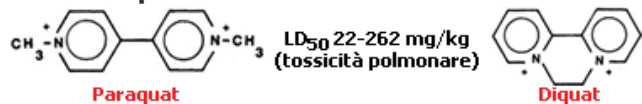


Figura 8
Doxorubicina

- antineoplastico antraciclinico
- affine alla cardiolipina della membrana mitocondriale interna
- provoca tossicità cardiaca (insufficienza cardiaca congestizia)
- è stato proposto l'uso di antiossidanti per limitare gli effetti collaterali

Figura 9
Produzione di superossido nel metabolismo della doxorubicina (mitocondri cardiaci)

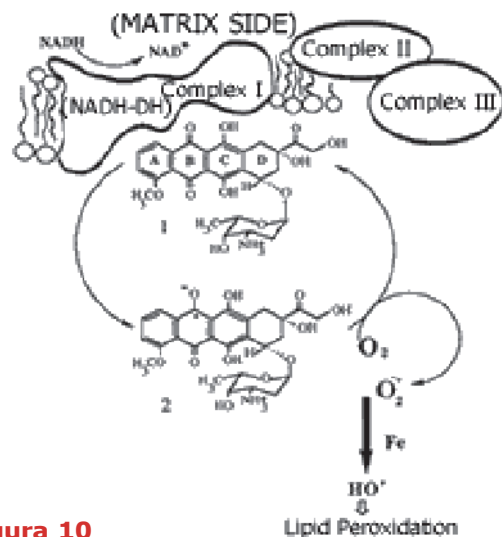


Figura 10
NITROFURANTOINA

- nitrofurano sintetico (furadantin) usato per curare le infezioni delle vie urinarie
- produce radicali liberi
- azione antimicrobica (danno al DNA batterico)
- tossicità polmonare (fibrosi)

Classico è infine il meccanismo d'azione tossica radicalica di numerosi composti organoclorurati, conosciuto fino dagli anni '60 (figura 11). Questi vengono dechlorurati e ossidati a livello epatico, con formazione di radicali ossidanti, che danno luogo a perossidazione dei lipidi di membrana (figura 12).

Un caso particolare di danno ossidativo è quello da paracetamolo, un comune analgesico antipiretico da banco che ad alta dose può portare a tossicità epatica e morte (figura 13). Per effetto del metabolismo ossidativo a livello epatico il paracetamolo viene ossidato a chinonimmina, un composto radicalico che reagisce con il glutatione (figura 14). Fino a che le scorte di glutatione cellulare non sono esaurite non si ha tossicità. Tuttavia, se la dose è eccessiva (> 4 g nei bambini e > 20 g negli adulti) le scorte di GSH epatico vengono esaurite e si produce una necrosi degli epatociti che può portare a morte.

Anche senza esposizione a sostanze tossiche esogene, la normale respirazione cellulare (figura 15) porta alla formazione di ROS. Ad esempio, nella membrana esterna mitocondriale è localizzato il sistema chinone-ubichinone che lega l'ossigeno e porta alla formazione di radicali (figura 16).

Figura 11

Formazione di radicali da sostanze chimiche di sintesi: interazione del CCl_4 con il P450

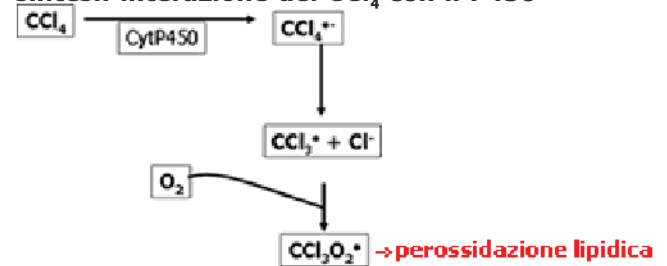


Figura 12

Intossicazioni da idrocarburi alogenati

- Tetracloruro di carbonio
- Tricloroetilene (trielina)
- Bromotriclorometano

Produzione di una specie radicalica con il P450 epatico

Figura 13

Intossicazioni da paracetamolo

- ingestione accidentale (bambini)
- 4-10 g: epatotossicità (bambini)
- suicidi (adulti)
- 10-15 g: epatotossicità (adulti)
- 20-25 g: dose potenzialmente letale (adulti)
- antidoti: composti sulfidrilici capaci di neutralizzare i radicali (N-cisteina o NAC)

Figura 14

Tossificazione del paracetamolo

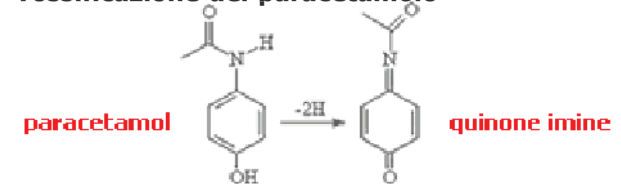
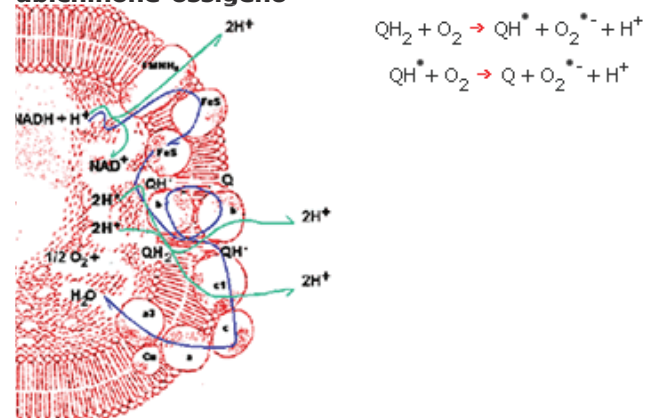


Figura 15



Figura 16

Produzione di ossigeno singoletto per interazione ubiquinone-ossigeno



I radicali danneggiano la membrana ed il DNA mitocondriale. Siccome il DNA mitocondriale è riparato con bassa efficienza (figura 17), ciò si traduce in un danno mitocondriale, evento che accompagna l'invecchiamento e apoptosi in molti tessuti, come il muscolo scheletrico, la cui cellularità si riduce con l'età.

La produzione di ROS è anche un meccanismo fisiologico costitutivo che permette la funzione di alcuni tipi di cellule: ad esempio, i granulociti neutrofili ed i macrofagi usano i ROS per inattivare i batteri fagocitati (figura 18). I macrofagi possono anche liberare con questo meccanismo un importante neuroregolatore: il nitrossido (figura 19).

La cellula sopravvive alla continua aggressione da parte dei ROS con sofisticati sistemi di difesa, enzimatici e non enzimatici (scavengers, chelanti dei metalli che attivano la reazione di Fenton, metaboliti (acido urico, taurina, carnitina), vitamine antiossidanti). Gli scavengers (letteralmente: avvoltoi, sciacalli, spazzini della natura) inattivano direttamente i ROS (figura 20). Azione scavenger hanno comuni vitamine, come la E (figura 21), il beta-carotene (figura 22), l'acido ascorbico (figura 23). Inoltre le nostre cellule hanno importanti scorte di glutazione (glutammilcisteinglicina, GSH, figura 24) che grazie a specifici enzimi (le GSH-perossidasi e GSH-transferasi), che insieme a enzimi non GSH-dipendenti, come le catalasi e superossido-dismutasi (figura 25), riescono a bloccare la maggior parte dei ROS prodotti nella cellula. Inoltre, le proteine che legano il ferro ed il rame hanno importanti azioni

Figura 17
Il DNA mitocondriale danneggiato ripara con maggiore lentezza

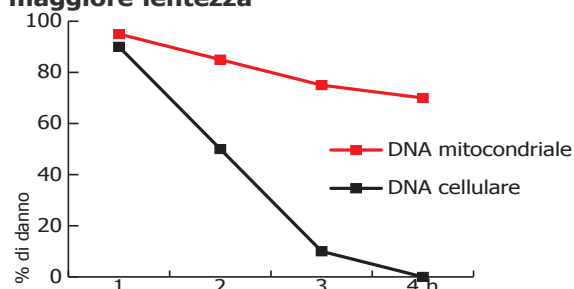
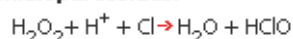


Figura 18
I granulociti (G) ed i macrofagi (M) producono ROS mieloperossidasi



nadph ossidasi



no sintasi

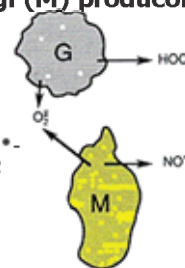
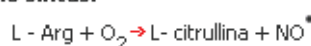


Figura 19
I granulociti (G) ed i macrofagi (M) producono ROS

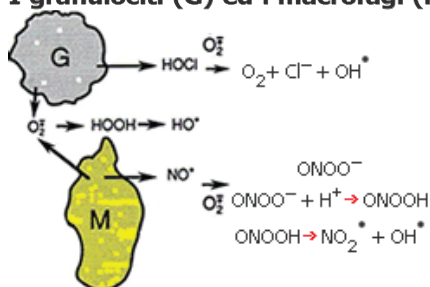


Figura 20
Azione scavenger

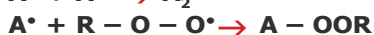


Figura 21
Vitamina E

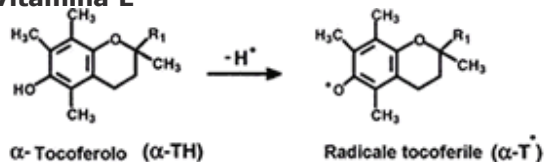


Figura 22
B-carotene

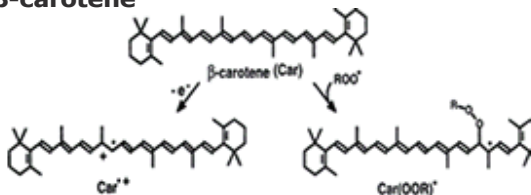
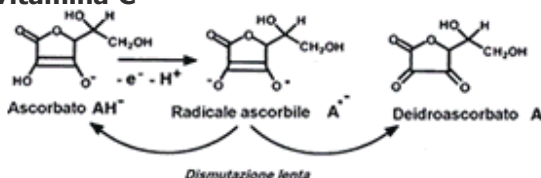


Figura 23
Vitamina C



antiossidanti, perché riducono i metalli liberi e così rendono meno probabile la reazione di Fenton e la produzione di OH^\bullet (figura 26).

Figura 24

Glutazione (GSH)

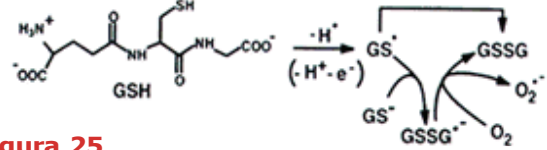


Figura 25

Sistemi di tossificazione enzimatici

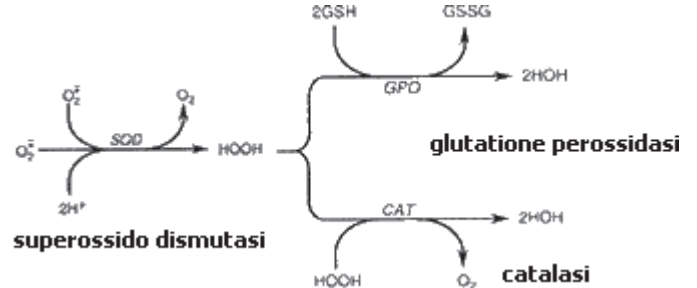


Figura 26

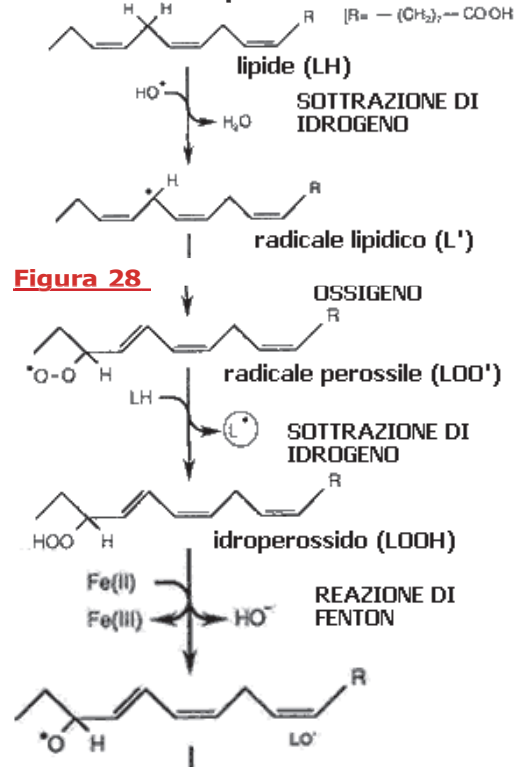
Sistemi antiossidanti che legano Cu e Fe

- transferrina (in circolo)
- ferritina (intracellulare)
- ceruloplasmina (in circolo)

Qualunque sia l'origine dei ROS che si liberano nella cellula, questi portano all'ossidazione dei lipidi di membrana (figura 27). I lipidi ossidati (negli alimenti sono noti come "grassi rancidi") divengono a loro volta sostanze pro-ossidanti e innescano una serie di reazioni a catena sulla membrana (figura 28). Tra i prodotti di queste reazioni ricordiamo anche gli etenodieni, composti altamente reattivi che provocano addotti al DNA (detti etenoaddotti, figura 29).

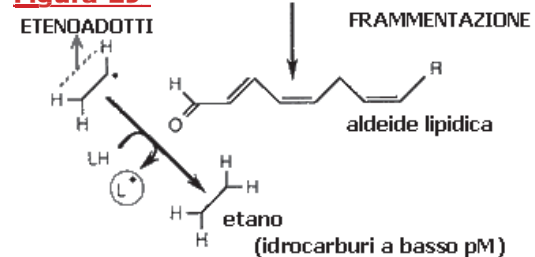
Figura 27

Perossidazione lipidica iniziata dal radicale ossidrilico



L'ossidazione dei lipidi di membrana porta alla perdita dell'integrità strutturale e funzionale delle membrane cellulari

Figura 29



I radicali liberi sono studiati in chimica con la tecnica dell'elettrospinirisonanza o ESR (**figura 30**). I radicali, data la loro breve emivita, devono essere prima stabilizzati con i cosiddetti spin-trapper per essere evidenziati (**figura 31**). Queste tecniche (**figura 32**) non sono particolarmente sensibili (vedono radicali alla concentrazione minima di 10^{-4} , 10^{-5} M).

Lo stress ossidativo inizia una serie di processi patologici schematizzati nella **figura 33**. L'ossidazione dei lipidi delle membrane cellulari può essere seguita studiando traccianti di perossidazione lipidica, come la malonildialdeide (MDA), oppure dosando le lipofuxine, che si formano nel corso di trattamenti cronici con ROS. Come mostra la **figura 34**, danni ossidativi continuati finiscono per compromettere il funzionamento delle cellule, e sono causa di importanti patologie.

Figura 30

Metodi di studio dei radicali liberi: ESR, electron spin resonance



Spettri di risonanza di spin elettronico: (a) grafico dell'assorbanza (A) in funzione della forza del campo (H) e (b) grafico della derivata prima di A (dA/dH) in funzione di H .

Figura 31

Segnale ESR da fegato di ratto con electron spin resonance

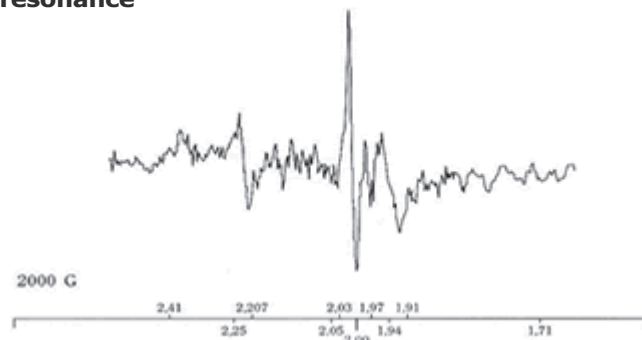
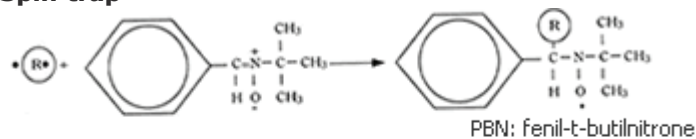


Figura 32

Spin trap



Spettri ESR in presenza di spin trap

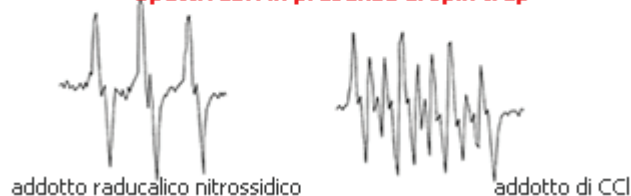


Figura 33



Figura 34

Conseguenze dell'interazione di radicali liberi con le proteine cellulari

Ossidazione dei gruppi tiolici e formazione di gruppi carbonilici



Danni ai sistemi di trasporto ionici e alterazioni di sistemi enzimatici



Impossibilità di mantenere i normali gradienti e disfunzioni metaboliche



Degradazione e morte cellulare

Data l'importanza dei danni da ROS, molte tecniche sono usate per quantizzare il danno ossidativo in vivo, come il dosaggio degli scavengers, degli enzimi antiossidanti e della perossidazione lipidica o dei suoi prodotti. I livelli d'antiossidanti fisiologici in circolo sono facilmente misurabili (**figura 35**) e sono direttamente controllati dalla dieta. Questo è uno dei motivi per cui la dieta è importante nella eziologia di molti processi patologici. Un altro approccio è quello di dosare i livelli degli enzimi antiossidanti, come la SOD, la catalasi e la GSHperossidasi o studiare i loro polimorfismi, che possono influenzarne la funzione (**figura 36**). Più comunemente si misurano gli effetti dei ROS studiando alcuni prodotti della ossidazione a livello cellulare, come l'MDA e le lipofuxine, o i dieni coniugati (**figura 37**). Queste alterazioni ossidative portano a danno cellulare (a volte irreversibile) agendo sull'integrità delle membrane extra ed intracellulari e quindi sull'omeostasi cellulare (**figura 38**).

Importante quanto il danno di membrana è il danno indotto dai ROS a livello del DNA, che può portare ad apoptosi e tumori. Il livello "fisiologico" di danno ossidativo al DNA oscilla intorno a 0.5-5 lesioni ossidative per milione di basi (**figura 39**).

I due sistemi correntemente usati per la misura al danno ossidativo del DNA sono il dosaggio della 8-OH-2'-desossiguanosina (8oxodG) (**figura 40**) con HPLC coulombmetrico (**figura 41**) e il comet assay (**figura 42**), che utilizza la migrazione del DNA in campo elettrico ad alto pH. Più danneggiato è il DNA e maggiormente migra, formando le cosiddette

Figura 35

Dosaggio degli scavenger. Concentrazioni plasmatiche (µM)

- Acido ascorbico 30-150
- GSH < 2
- α-tocoferolo 15-40
- β-carotene 0,3-0,6
- Gruppi SH proteici 350-500

Figura 36

Dosaggio degli enzimi antiossidanti

metodi spettroscopici: SOD e catalasi
 GSH-Px (GLUTATIONE PEROSSIDASI)
 $2\text{GSH} + \text{R-O-OH} \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O} + \text{R-OH}$ (butile idroperossido)
 $\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$ (lettura a 340 nm)

Figura 37

Markers della perossidazione lipidica

MDA (malonildialdeide) reazione colorimetrica con acido tiobarbiturico- lettura a 532nm. HPLC
Lipofuscine. Estrazione e determinazione fluorimetrica
Dieni coniugati nelle membrane. Lettura a 233 nm
Idrocarburi volatili. Gascromatografia

Figura 38

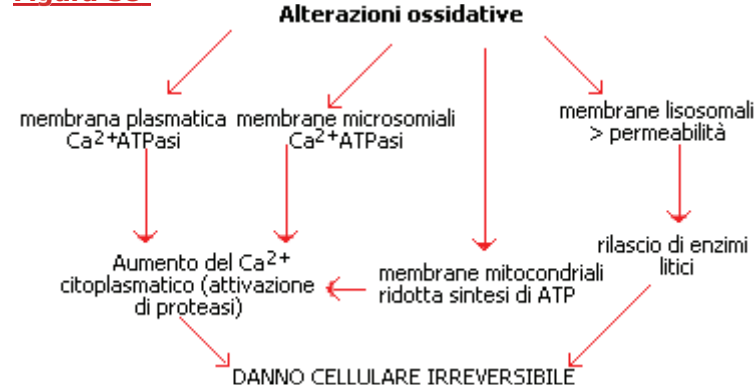


Figura 39

Frequenza di errori ossidativi del DNA di mammifero

- (2-5 x 10⁶ basi) metodi chimici
- (0.5 x 10⁶ basi) comet assay, alkaline unwinding

Figura 40

Analisi del danno del DNA

Dosaggio HPLC della 8-OH-2'-desossiguanosina

Figura 41

Misura chimica del danno ossidativo al DNA idrolisi del DNA

nucleasi P1 50 UI/mg di DNA 1 h 37° C
 foosfatasi alcalina 10 IU/mg di DNA 1 h 37° C

Determinazione HPLC

8OHdG/dG x 10⁻⁶ EC detector:
 2dG: UV detector

“comete”, che possono essere quantizzate e danno una misura del danno del DNA (**figura 43**).

Nella **figura 43, in alto a sinistra**, si può osservare la cometa di DNA di una cellula danneggiata mentre, **a destra**, è riportata l'analisi dell'immagine della cometa e del DNA presente ancora all'interno del nucleo. Le cellule normali (**figura 43, in basso**) non formano comete. Esistono anche metodiche colorimetriche, che possono all'interno di un tessuto identificare le cellule con alto danno ossidativo; particolari coloranti infatti evidenziano solo le cellule con grave danno ossidativo, **in rosso nella figura 44**).

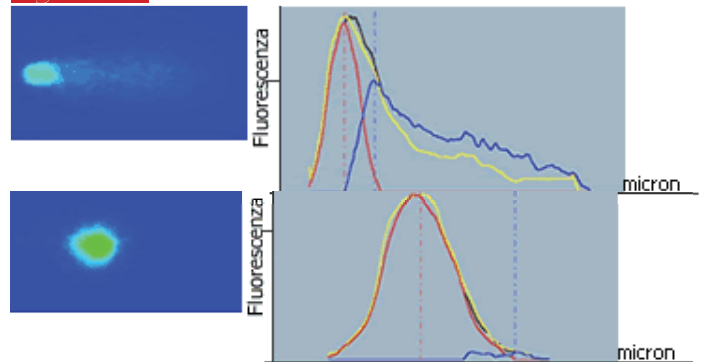
Diverse patologie umane sono legate all'eccesso di radicali dell'ossigeno; i principali meccanismi patogenetici coinvolti nelle sindromi da iperossigenazione, nel danno ischemico, nelle malattie autoimmuni e nel diabete sono descritte nella **figura 45**; i meccanismi presunti responsabili del morbo di Parkinson, Alzheimer e dei danni da fumo e da alcol sono descritte nella **figura 46**. Come si vede molte delle più importanti alterazioni patologiche umane sono legate alla eccessiva formazione di radicali dell'ossigeno.

Figura 42

Il comet assay. Microscopio a fluorescenza e analisi di immagine per il comet assay



Figura 43



Il danno al DNA (rotture semplici e danno ossidativo sulle basi) è espresso come percentuale di DNA migrato nella coda della cometa (linea blu)

Figura 44

Colorazione in vivo di cellule per lo studio del danno ossidativo

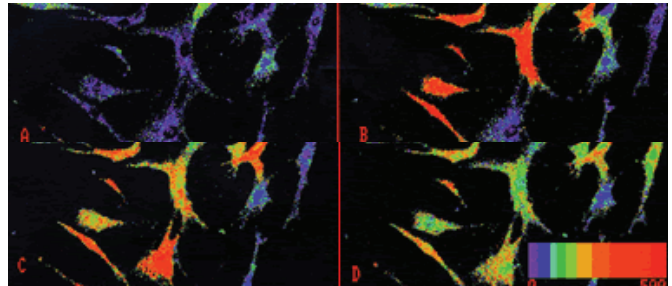


Figura 45

Esempi di patologie per cui è stato proposto un ruolo dei radicali liberi

Patologia	Meccanismo proposto	Livelli di antiossidanti
Sindromi da iperossigenazione	O ₂	▼VitE
Danno ischemico/ Riperfusione	Xantina ossidasi, O ₂	?
Malattie autoimmuni	NADPH ossidasi	▼GSH ▼VitC
Irradiazione	Fissione H ₂ O	
Diabete mellito	Glicazione proteine	▼GSH ▼VitC

Figura 46

Patologia	Meccanismo proposto	Livelli di antiossidanti
Parkinson	Metabolismo dopamina-MPTP	▼GSH
Alzheimer	Attivazione microglia	?
Patologie legate al fumo	Radicali liberi	▼GSH ▼VitC
Cirrosi epatica da alcool	Cyt P450 Perossidi lipidici	▼GSH ▼VitC

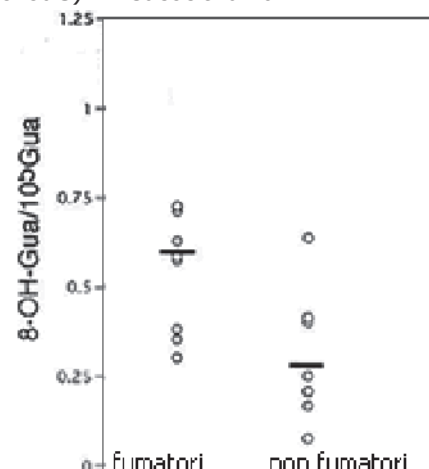
Un esempio classico è fornito dalla **figura 47**, da misure del laboratorio di tossicologia di Firenze: il fumo di sigaretta è un potente agente tossico, non solo per la presenza di cancerogeni, ma anche per la produzione di sostanze ossidanti, che aumentano il danno cellulare, per esempio a livello di cellule circolanti come i leucociti.

Passiamo adesso ad esaminare alcuni dei più importanti processi patologici legati alla produzione di ROS.

L'arteriosclerosi è un processo causato dalla deposizione di lipidi e lipoproteine ossidate nell'intima dei vasi, con successiva mobilizzazione di cellule macrofagiche, danno endoteliale e proliferazione delle cellule muscolari lisce (**figura 48**). Le placche ateromatose hanno alti contenuti di lipidi e colesterolo ossidati al loro interno (**figura 49**).

Figura 47

Effetto del fumo sul danno ossidativo al DNA, misurato come livelli di 8-OH-2'-desossi guanosina (8oxodG) in leucociti umani

**Figura 48**

Effetto delle lipoproteine ossidate nel processo di aterogenesi

**Figura 49**

Formazione di una placca ateromatosa



Il fumo di sigaretta è un importante cofattore di questi processi, perché aumenta il danno ossidativo a livello della parete vascolare. È interessante ricordare che uno dei fattori protettivi contro questo processo, a parità di livello di colesterolo LDL (che è maggiormente soggetto a precipitare nell'intima dei vasi), è costituito dai polifenoli del vino, responsabili del cosiddetto "Paradosso francese" (figura 51). I polifenoli del vino (figura 52) riducono l'ossidazione delle LDL con un meccanismo anti ossidante diretto e mediante la chelazione di ferro e rame (figura 53) e così hanno un'azione anti-arteriosclerotica, insieme ad altri antiossidanti alimentari (figura 54).

Figura 50

Struttura di una placca ateromatosa

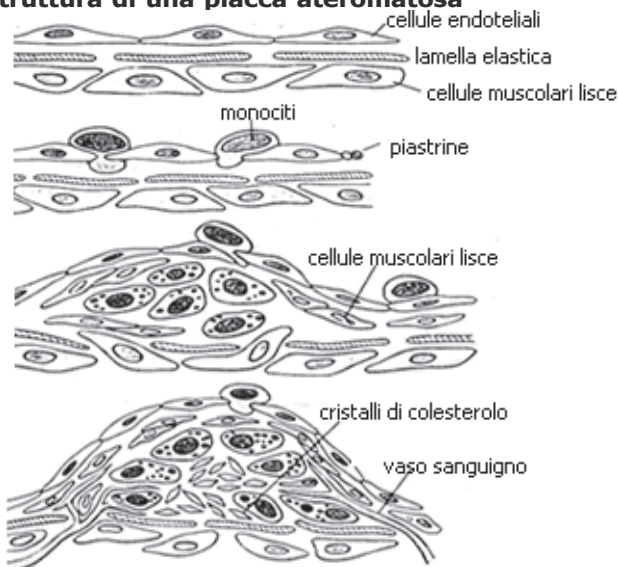


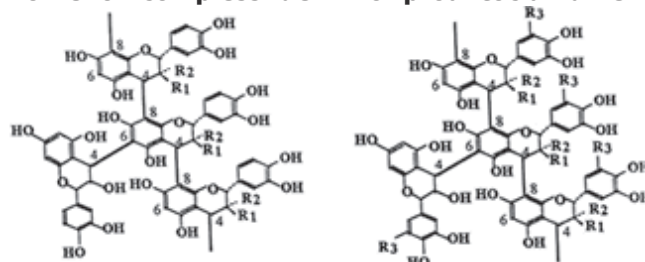
Figura 51

Il paradosso francese

In molte regioni della Francia la morbilità e la mortalità per malattie cardiovascolari sono significativamente più basse rispetto ai paesi del Nordeuropa e agli USA malgrado l'alto consumo di grassi e acidi grassi saturi

Figura 52

Polifenoli complessi del vino: proantocianidine



Unità costitutive

catechina: $R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=H$

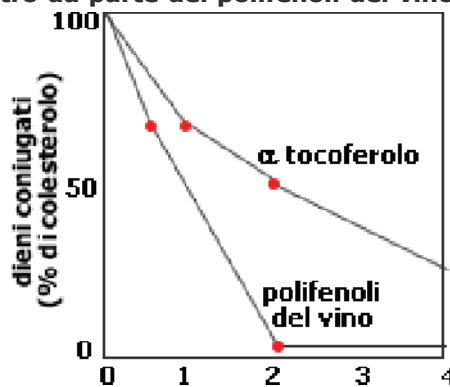
epicatechina: $R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=H$

epicatechin-3-O-gallato: $R_1=H$, $R_2=O-CO-C_6H_2(OH)_3$

epigallocatechina: $R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=OH$

Figura 53

Inibizione dell'ossidazione delle lipoproteine LDL in vitro da parte dei polifenoli del vino



Frankel et al., Lancet. 341, 454-457, 1993

Secondo un'accreditata teoria, avanzata dallo scienziato americano Bruce Ames (figura 55), il danno ossidativo darebbe uno dei fattori determinanti dell'invecchiamento. Infatti, il livello di respirazione è correlato inversamente con la durata della vita (figura 56) e il consumo di ossigeno è correlato con il danno ossidativo (ad esempio, espresso come escrezione urinaria di basi ossidate dell'ossigeno, 8-idrossi-2'-desossiguanosina) (figura 57).

Questo fenomeno non è esclusivo dei mammiferi. Infatti, moscerini transgenici con alti livelli di catalasi e superossidodismutasi hanno una vita più lunga e un minore livello di proteine cellulari ossidate (figura 58).

Nell'invecchiamento cerebrale le aree più suscettibili al danno ossidativo sono la corteccia (sede dei processi cognitivi) lo striato e la Substantia nigra (SN) (che controllano la motilità) e l'ipotalamo, che controlla le funzioni endocrine. Gli animali anziani hanno un elevato danno al DNA in tutte le aree cerebrali ed in particolare nella SN, nella corteccia e nell'ipotalamo (figura 59). Questi processi, pur con alta variabilità individuale, sono progressivi con l'invecchiamento (figura 60).

Figura 54

Sostanze antiossidanti presenti nella dieta:

- vitamina E
- vitamina C
- vitamina A
- polifenoli
- carotenoidi

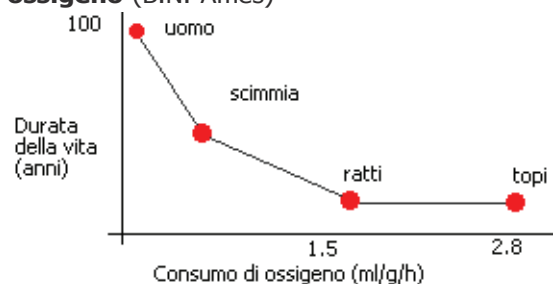
Figura 55

L'invecchiamento è dovuto all'accumolo di danno ossidativo



Figura 56 (B.N.Ames)

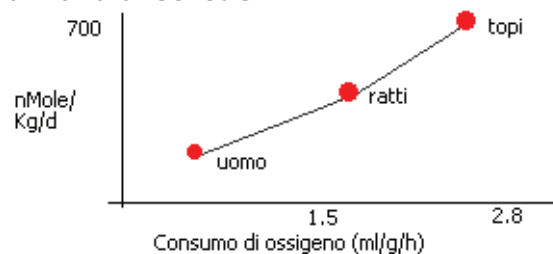
Relazione tra durata della vita e consumo di ossigeno (B.N. Ames)



Rielaborato da Ames, *Mutat Res* 21, 41-46, 1989

Figura 57

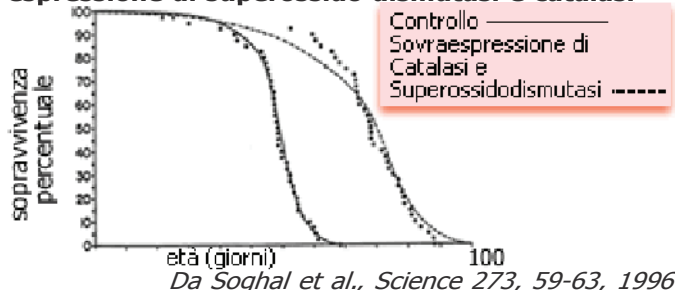
Relazione tra consumo di ossigeno ed escrezione urinaria di 8oxodG



Idem

Figura 58

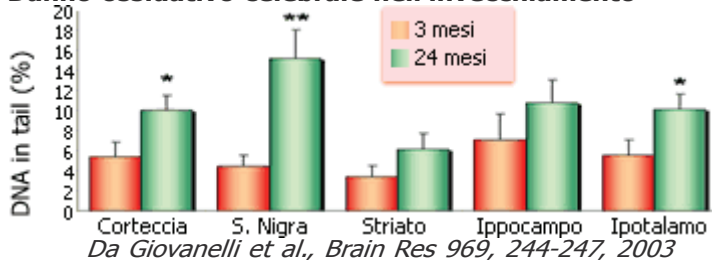
Curve di sopravvivenza di drosofile con diversa espressione di superossido dismutasi e catalasi



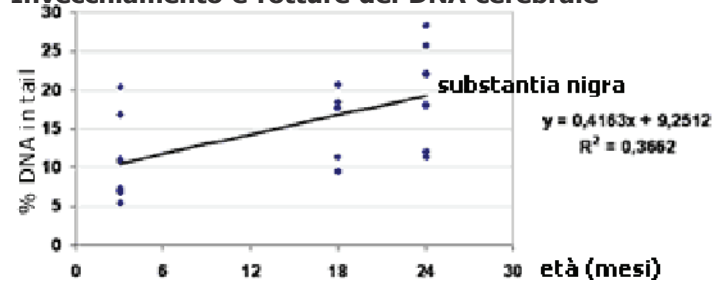
Da Soghal et al., *Science* 273, 59-63, 1996

Figura 59

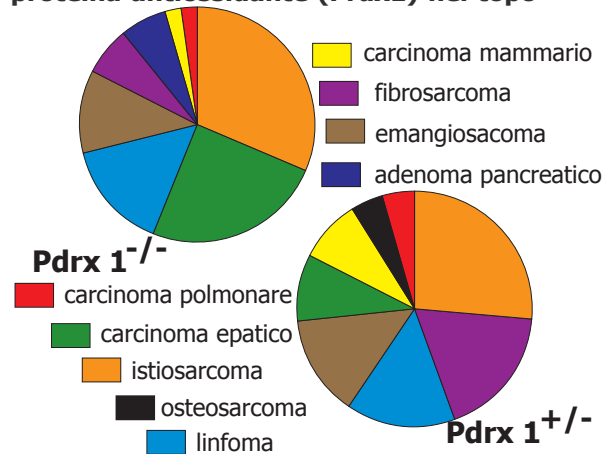
Danno ossidativo cerebrale nell'invecchiamento



Da Giovanelli et al., *Brain Res* 969, 244-247, 2003

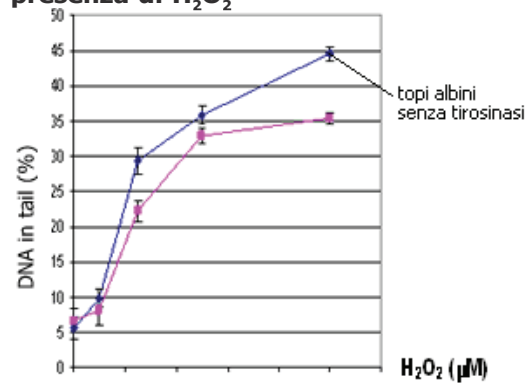
Figura 60**Invecchiamento e rotture del DNA cerebrale**

Da Giovanelli et al., *Brain Res* 969, 244-247, 2003

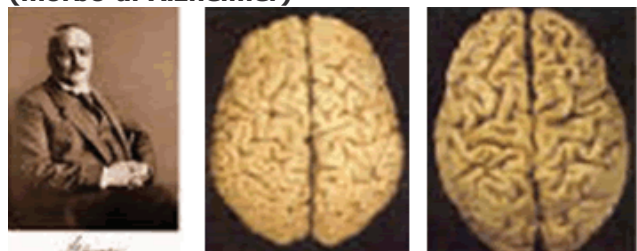
Figura 61**Danno ossidativo e tumori per mutazione di una proteina antiossidante (Prdx1) nel topo**

Gli animali privi di Prdx1 (+/-) sviluppano tumori spontanei, quelli privi di Prdx1 (-/-) hanno un alto danno ossidativo

Neuman et al., *Nature* 424, 561, 2003

Figura 62**Danno ossidativo in topi privi di tirosinasi (blu) e wild type (rosso). Fibroblasti in cultura in presenza di H₂O₂**

Saran et al., *Oncogene* 23, 4130-4135, 2004

Figura 63**Patologie da radicali liberi. La demenza senile (morbo di Alzheimer)**

Ipotesi recenti suggeriscono che l'aumento di danno ossidativo sia importante anche nella cancerogenesi. Infatti, nei fenomeni infiammatori cronici si ha produzione di ROS che sono co-cancerogeni. Una dimostrazione sperimentale diretta della correlazione tra danno ossidativo e tumori è fornita da un lavoro recente nella quale sono stati creati topi knock-out per una proteina antiossidante, la peroxiredoxina-1, o Prdx1. Questi topi invecchiano precocemente, sviluppano numerosi tumori spontanei ed hanno un elevato livello di danno ossidativo (figura 61).

Un lavoro recente dimostra che l'assenza di un enzima coinvolto nel metabolismo della tirosina, la tirosinasi, porta nei topi ad albinismo, associato ad una maggiore responsività alla cancerogenesi cutanea da policiclici (dimetilbenzantracene, DMBA) ed un aumento della sensibilità ad agenti ossidanti come l'acqua ossigenata (figura 62).

Una patologia importante correlata con il danno ossidativo è la malattia di Alzheimer, che porta il nome del patologo tedesco suo scopritore (figura 63). Questa malattia è provocata dalla deposizione di una proteina amorfa (beta amiloide, contenuta nelle "placche" cerebrali del morbo di

Alzheimer) che porta a morte cellulare, atrofia corticale e, infine, demenza (**figura 64**). La malattia ha un'origine genetica complessa e multifattoriale, ed è legata a varie mutazioni ereditarie, tra cui le più importanti sono a carico della cosiddetta "presenilina" e della APP, o proteina precursore dell'amiloide (**figura 65**). Le preseniline scindono l'APP (**figura 66**) formando dei frammenti peptidici neurotossici (il peptide AP 1-42) (**figura 67**), che precipitando nella cellula nervosa insieme all'apolipoproteina E (Apo E), portano ad un aggregato (la placca amiloide) che conduce alla liberazione di ROS (**figura 68**) ed infine alla disfunzione ed alla morte cellulare (**figura 69**). In tutto il mondo sono in fase di studio terapie per bloccare una delle fasi di questo complicato processo. È comunque noto che una semplice terapia con antinfiammatori (aspirina a basso dosaggio) riduce il rischio di Alzheimer. Sembra anche che un effetto protettivo abbia una conservata attività intellettuale fino alla più tarda età. Infatti, secondo i dati del famoso "Nun study" sulle monache americane, le monache laureate con funzione dirigenziale che mantengono impegni fino alla vecchiaia hanno un rischio minore di sviluppare la malattia. Una possibile spiegazione del fenomeno è forse la capacità dell'attività mentale continuata di rigenerare sinapsi e funzioni danneggiate a livello cerebrale (**figura 70**).

Figura 64

Il morbo di Alzheimer è una grave patologia degenerativa cerebrale caratterizzata da:

- deposito di placche proteiche nel cervello (beta amiloide)
- morte neuronale
- atrofia cerebrale
- demenza

Figura 65

Il morbo di Alzheimer è una malattia a base ereditaria con mutazioni di due proteine (presenilina e APP, amiloide precursor protein)

Figura 66

Le **preseniline** sono enzimi proteolitici di membrana che scindono l'APP, o amiloide-precursor protein

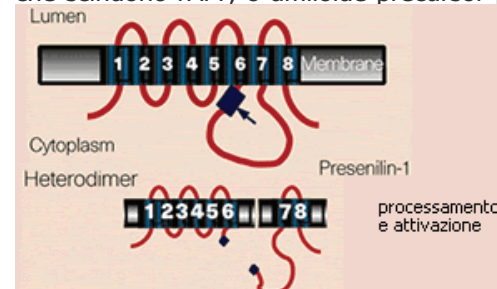


Figura 67

Alcune varianti di presenilina digeriscono meglio la APP e producono un peptide neurotossico Beta Amiloide 1-42 (Aβ)

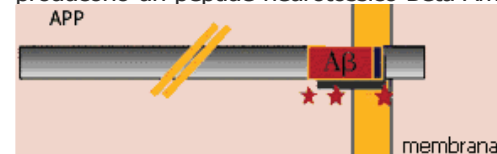
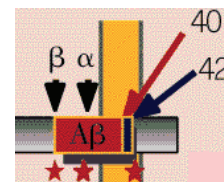


Figura 68

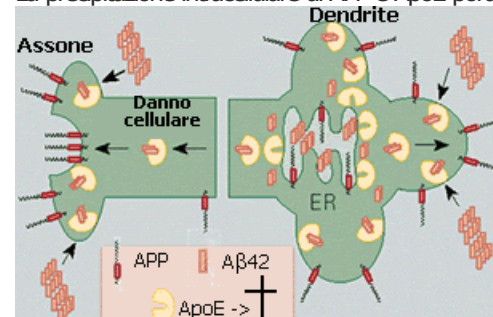
Il peptide β amiloide 1-42 è resistente alla digestione



Forma aggregati di amiloide 1-42 (Aβ 42) con alfa chimotripsina e apolipoproteina E (ApoE) che producono ione superossido

Figura 69

La precipitazione intracellulare di APP e ApoE porta a morte cellulare



da Berger et al., Nature 388, 878-881, 1997, modificato

Figura 70

Lo studio delle suore americane

- 678 partecipanti (età 75-102)
- Tests di attività mentale (MMSE)
- Il punteggio diminuisce con l'età
- Le laureate hanno una diminuzione minore di punteggio e una incidenza minore di Alzheimer

Flishman, Brain 128, 2006-2015, 2005

rox

lezione n. 11

Riduzione dell'apporto calorico e danno ossidativo

La riduzione dell'apporto calorico si associa, almeno nei roditori, a variazioni della durata della vita e dell'incidenza di comuni patologie associate all'invecchiamento, come i tumori.

I roditori hanno un comportamento alimentare simile al nostro, nel senso che non diminuiscono l'assunzione di cibo con l'invecchiamento, nonostante che il loro consumo di calorie si riduca (**figura 1**). Questo comportamento si associa ad un aumento di peso nell'età adulta e nella vecchiaia. Numerosi ricercatori hanno studiato gli effetti dell'aumento di peso sulle condizioni di salute degli animali da esperimento. Se si riduce l'apporto calorico ad una popolazione di ratti, il risultato è una considerevole estensione della durata della vita. Questi effetti si notano solo con una marcata riduzione dell'apporto calorico (circa del 60%). Come si vede (**figura 3, fracciati superiori**) gli animali a restrizione calorica mantengono più o meno il peso raggiunto in età giovanile. Le variazioni di peso non sembrano influenzate dal livello di proteine (**figura 2**). L'effetto di una dieta ipocalorica è facilmente apprezzabile quando espresso in forma di sopravvivenza percentuale (**figura 3**).

Nelle popolazioni umane la funzione per calcolare il peso "ideale" di una popolazione umana è il BMI o Body Mass Index (**figura 4**).

Figura 1
Peso corporeo e dieta (ratto)

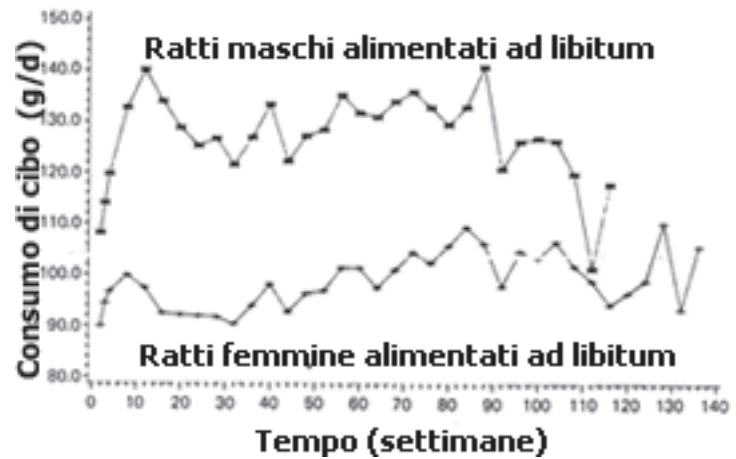
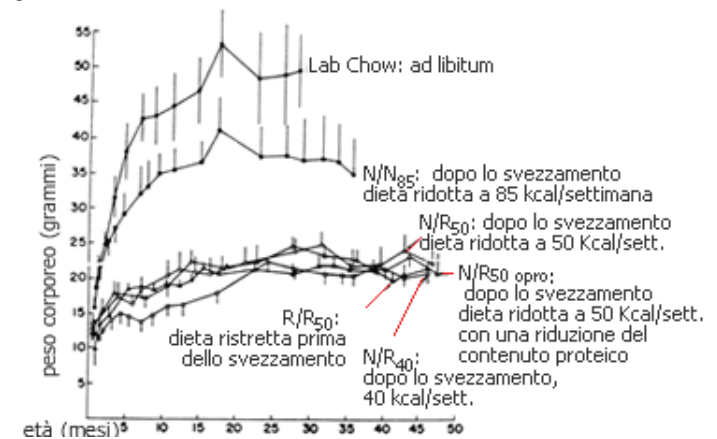
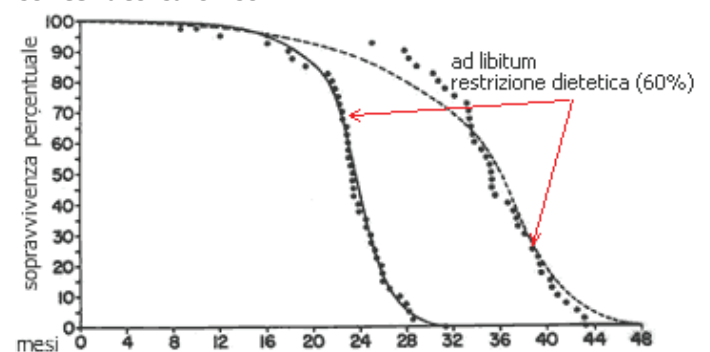


Figura 2
Riduzione dell'apporto calorico e accrescimento ponderale nel ratto



Weindruch et al., *J Nutr.* 116, 641-654, 1986

Figura 3
Curve di sopravvivenza di ratti a diete con diverso contenuto calorico



Yuric et al., *Exp Gerontol* 20, 107-117, 1985

Figura 4
Body Mass Index (BMI)
 $BMI = p(\text{kg})/h^2(\text{m})$

Si considera ottimale un BMI che non superi 25; si parla di obesità quando il BMI supera 30; sotto 18 BMI indica una magrezza patologica

(figura 5). La quantità di calorie ottimali è funzione della massa corporea e dell'esercizio fisico. Una parte di energia viene spesa anche nella digestione degli alimenti (figura 6).

Estreme variazioni del BMI (< 20 o > 25) si associano ad una maggiore mortalità, sia per magrezza patologica che per obesità (figura 7).

I valori ottimali di BMI con un minimo di mortalità si hanno tra 20 e 25. A titolo di esempio riportiamo i valori antropometrici di una classe di CTF di Firenze dell'anno 2000. I dati sono espressi come "box and whisker plot" (alla lettera grafico con scatola e baffi;

la linea centrale rappresenta la mediana, il "box" rettangolare contiene i due quartili centrali (cioè il 25% della popolazione sotto la mediana ed il 25% sopra la mediana); i "baffi" il massimo e minimo.

I maschi sono più alti dei loro padri (figura 8), ed hanno una mediana di BMI normale, con soggetti collocati nel settore della magrezza patologica e della obesità (figura 9). Le femmine sono un pò più alte delle madri, salvo quelle con menarca precoce (gli estrogeni prima della fine dell'accrescimento bloccano la crescita delle cartilagini epifisarie) (figura 10). Il peso è molto variabile nelle femmine (figura 11) e il BMI è ai limiti inferiori della norma. Nessuna femmina raggiunge la soglia di obesità, ma diverse sono nella zona di magrezza patologica (figura 12).

I maschi sono più alti dei loro padri (figura 8), ed hanno una mediana di BMI normale, con soggetti collocati nel settore della magrezza patologica e della obesità (figura 9). Le femmine sono un pò più alte delle madri, salvo quelle con menarca precoce (gli estrogeni prima della fine dell'accrescimento bloccano la crescita delle cartilagini epifisarie) (figura 10). Il peso è molto variabile nelle femmine (figura 11) e il BMI è ai limiti inferiori della norma. Nessuna femmina raggiunge la soglia di obesità, ma diverse sono nella zona di magrezza patologica (figura 12).

Le femmine sono un pò più alte delle madri, salvo quelle con menarca precoce (gli estrogeni prima della fine dell'accrescimento bloccano la crescita delle cartilagini epifisarie) (figura 10). Il peso è molto variabile nelle femmine (figura 11) e il BMI è ai limiti inferiori della norma. Nessuna femmina raggiunge la soglia di obesità, ma diverse sono nella zona di magrezza patologica (figura 12).

Nessuna femmina raggiunge la soglia di obesità, ma diverse sono nella zona di magrezza patologica (figura 12).

Figura 5

Misure di BMI

- <18 magrezza
- 20-25 normalità
- 25-30 sovrappeso
- >30 obesità

Figura 6



Figura 7

Effetti di variazioni del BMI sulla mortalità umana

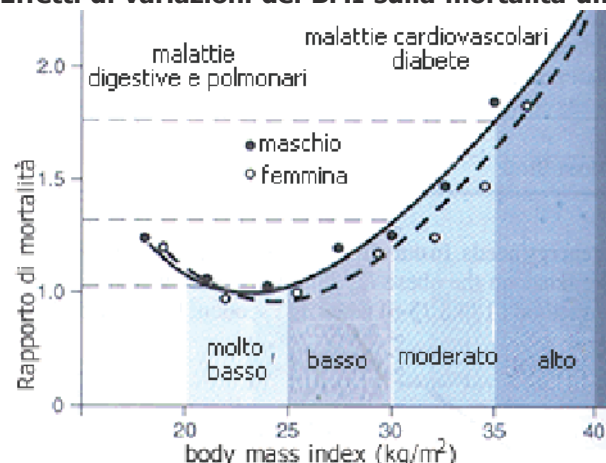


Figura 9

CTF 2000, maschi, BMI

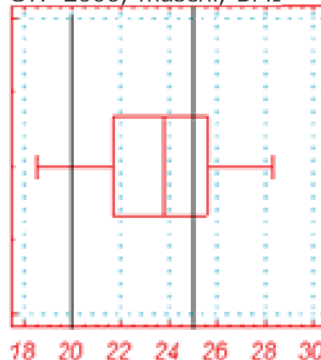


Figura 8

CTF 2000, maschi, altezza

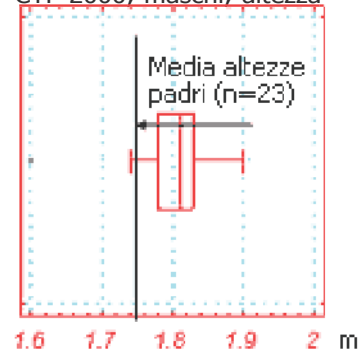


Figura 11

CTF 2000 femmine, peso

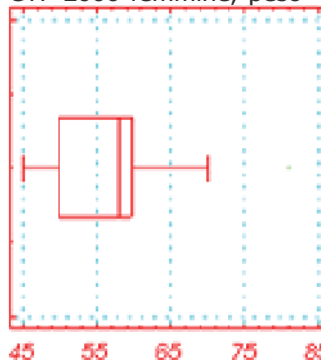
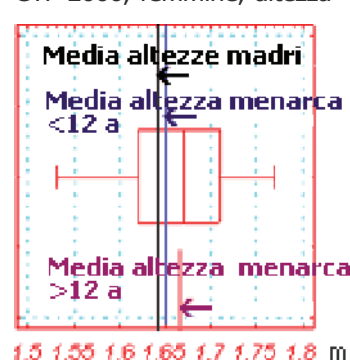


Figura 10

CTF 2000, femmine, altezza



Quali sono i motivi di una aumentata sopravvivenza con la riduzione calorica o, se si vuole, di un aumentata mortalità con un eccesso di assunzione di calorie?

Questi quesiti sono stati chiariti da esperimenti di restrizione calorica nei roditori. Un effetto importante della riduzione calorica è la riduzione dell'incidenza di tumori. La restrizione calorica riduce tumori sperimentali nel ratto (ad esempio tumori mammari da dimetilbenzantracene (DBA) nel ratto (**figura 13**).

Quali sono i meccanismi di questo effetto? La restrizione calorica riduce il metabolismo basale negli animali giovani. Solo verso la fine della vita si ha una riduzione di metabolismo anche negli animali alimentati ad libitum (**figura 14**). La riduzione calorica riduce la proliferazione cellulare in tutti gli organi importanti dal punto di vista della cancerogenesi, come il coloretto, l'esofago, la mammella, la cute e la vescica (**figura 15**); la riduzione della proliferazione cellulare riduce la probabilità di accumulare errori mitotici e di sviluppare neoplasie. La riduzione della proliferazione è forse da mettere in relazione alla riduzione dei fattori di crescita (**figura 16**).

Figura 12

CTF 2000, femmine, BMI

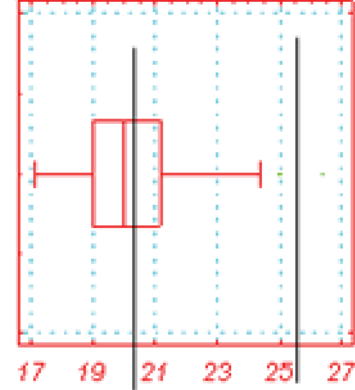
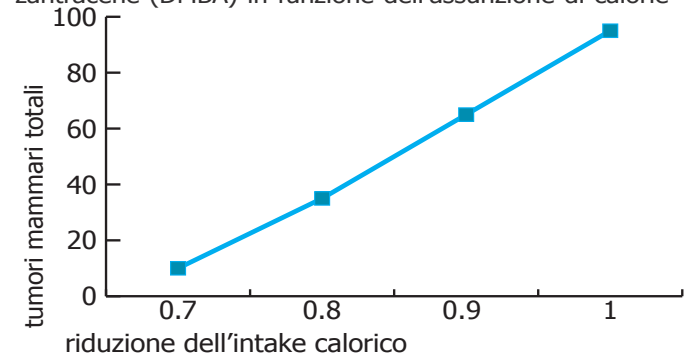


Figura 13

Frequenza % di tumori mammari nel topo da dimetilbenzantracene (DMBA) in funzione dell'assunzione di calorie



Medina et al., Cancer Res 40, 368-373, 1980

Figura 14

Metabolismo basale per unità di massa corporea magra (ratto)

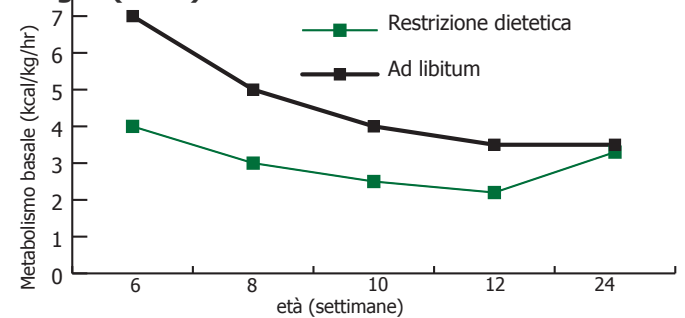
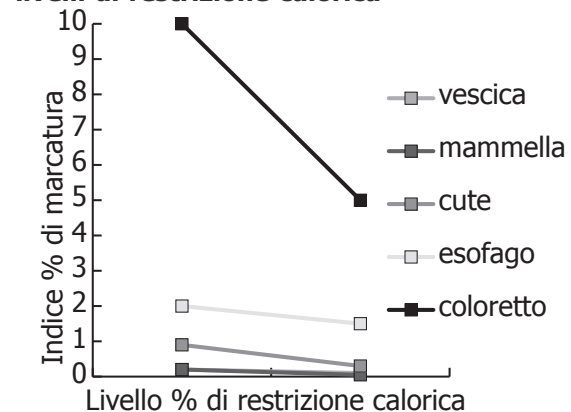


Figura 15

Turnover cellulare nel ratto in relazione a vari livelli di restrizione calorica



Lu et al., Mech Ageing Dev. 123, 391-400, 2002

La riduzione dell'apporto calorico riduce anche il danno ossidativo al DNA. Questo effetto è stato dimostrato dosando marcatori di danno ossidativo al DNA come la timina glicole e la 8-oxodG (8-OH-2'-desossiguanosina) (**figura 17**) anche in popolazioni umane sottoposte sperimentalmente a diete ipocaloriche (**figura 18**).

Nonostante l'enfasi della moda e della cultura popolare moderna a favore della magrezza (**figura 19**), l'obesità è divenuta una malattia frequente anche in Europa, sia nei maschi (**figura 20**) sia nelle femmine (**figura 21**) e diverrà ancor più frequente secondo le previsioni di esperti di popolazioni, basate sulle tendenze attuali (**figura 22**).

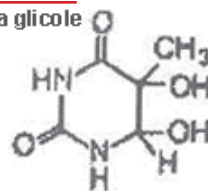
Figura 16

La riduzione dell'apporto calorico riduce i livelli del fattore di crescita IGF (insuline-like growth factor)

S. Hurstin, WCRF/AICR conference, Washington 2004

Figura 17

Timina glicole



8-OxodG

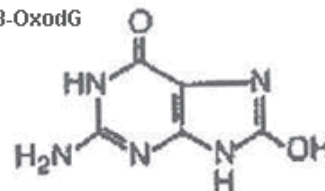


Figura 18

Livelli di 8-OH-2'-desossiguanosina (8oxodG) (nmole/kg/d) nelle urine umane in diete ipocaloriche

	Dieta normale (2100 ±200 kcal/die)	Dieta a basse calorie (1100 ±100 kcal/die)
8oxodG	0.34 ± 0.06	0.11± 0.03
Peso corporeo (kg)	82.0 ± 0.5	78.5 ± 0.5

Karam e Simic, Basic Life Sci 49, 483-489, 1988

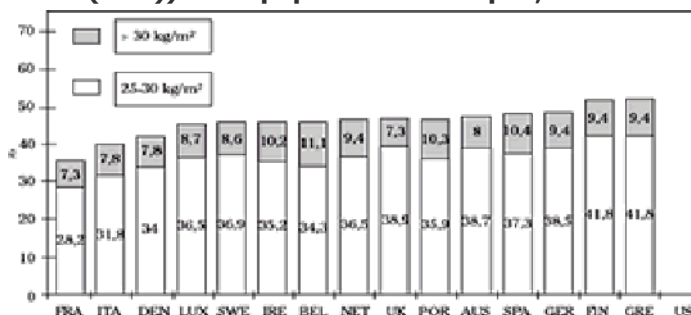
Figura 19

Due ideali a confronto: XIX sec. la grande baigneuse di Renoir e XX sec. Twiggy



Figura 20

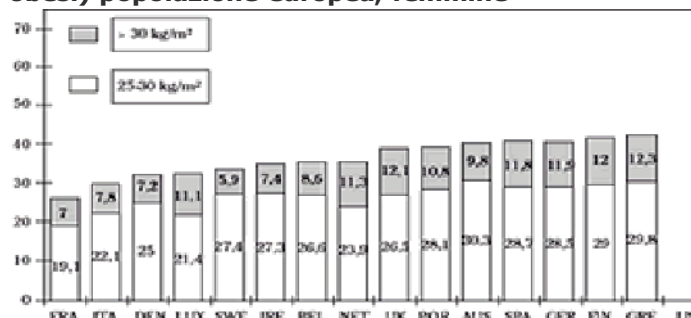
Prevalenza % di soggetti sovrappeso (BMI>25 o obesi (>30)) nella popolazione europea, maschi



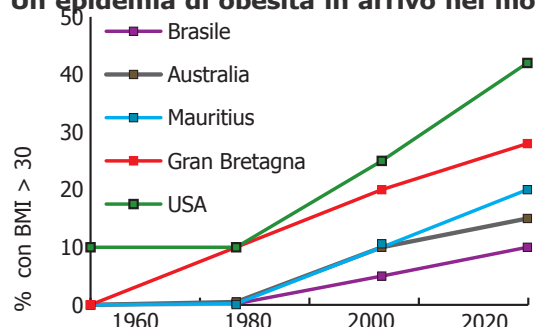
James, Clin Dermatol 22, 276-280, 2004, modificato

Figura 21

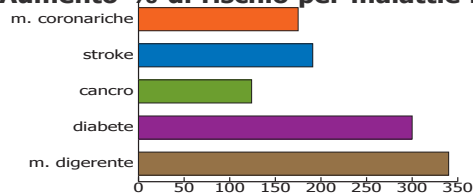
Prevalenza % di soggetti sovrappeso (BMI>25 o obesi (>30)) popolazione europea, femmine



James, Clin Dermatol 22, 276-280, 2004, modificato

Figura 22**Un epidemia di obesità in arrivo nel mondo**

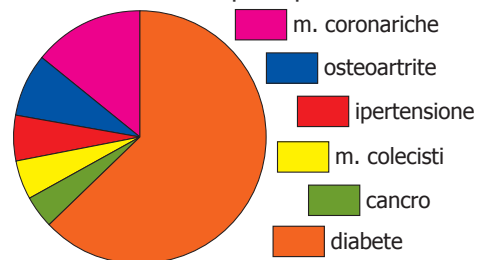
Rielaborato da dati della European Environmental Agency
URL <http://www.environmentaldefense.org>

Figura 23**Aumento % di rischio per malattie negli obesi**

Van Italie et al., *Am J Clin Nutr* 32, 23-27, 1979

Figura 24

Onere finanziario % delle principali malattie legate all'obesità

**Figura 25****Stima quantitativa di rischi % evitabili di cancro**

Fattori	Mortalità (evitabile) per cancro	
	stima	range
Tabacco	30	25-40
Alcool	3	2-4
Dieta	35	10-70
Additivi alimentari	<1	5-2
Abitudini sessuali	7	1-13

Peto e Doll, *J Natl Cancer Inst* 66, 1191-1308, 1991

Figura 26**Stima quantitativa di rischi % evitabili di cancro**

Fattori	Mortalità (evitabile) per cancro	
	stima	range
Esposizione occupazionale	4	2-8
Prodotti industriali	<1	<1-2
Fattori iatrogeni	1	0.5-3
Fattori geofisici	3	2-4
Infezioni	10?	1-?
Altro	?	?

Idem

Figura 27**Aumento di alcuni tipi di tumori negli obesi**

- Endometrio
- Rene
- Esofago
- Colon
- Mammella

Calle, *Oncogene* 38, 6365-78, 2004

L'obesità è associata ad un aumento di numerose patologie (diabete, malattie del digerente, malattie cardiovascolari, cancro (figura 23)). La terapia di queste malattie è un carico importante sui bilanci della sanità pubblica (figura 24).

Per quanto riguarda i tumori, sappiamo che la dieta e il tabacco sono le più importanti cause dell'eziologia dei tumori umani (figura 25). Contrariamente all'opinione corrente fattori ambientali ed occupazionali hanno una rilevanza assai minore (figura 26). I principali tumori umani hanno una prevalenza superiore negli obesi (figura 27).

La riduzione dell'apporto calorico estrema può portare ad una importante riduzione della crescita (figura 28); un'eccessiva insistenza sulla cultura della magrezza è associata anche ad un aumento dei casi di "anoressia mentale" o "nervosa". Sono segnalate anche nel nostro paese come nel resto d'Europa frequenti casi di disturbi alimentari gravi (anoressia, bulimia e "binge eating" o tendenza all'abbuffata) tra i giovani di entrambi i sessi in Europa (figura 29).

Controllare il proprio peso e mantenerlo nei limiti della norma, anche con l'aumento dell'esercizio fisico, è tuttavia un approccio ragionevole, che può contrastare l'aumento di malattie associate all'obesità (diabete, malattie cardiovascolari, tumori, malattie osteoarticolari e della colecisti) ed alla magrezza eccessiva (anoressia).

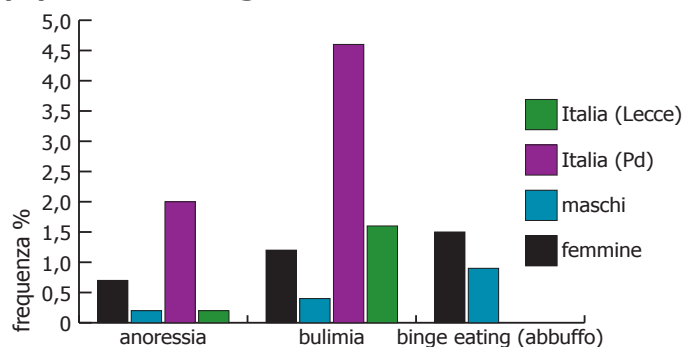
Figura 28
Gli effetti della miseria e malnutrizione alla fine del XIX secolo



Gemelli identici: quello di destra è stato adottato da una famiglia benestante.

Da Favilli, *Patologia generale*, CEA ed., Italia, 1954

Figura 29
Incidenza dei disturbi della nutrizione in popolazioni norvegesi e italiane



Ribases et al., *Hum Mol Genet.* 13, 1205-1212, 2004

rox

lezione n. 12

Epidemiologia

L'epidemiologia è una scienza nata alla fine dell'Ottocento, quando si occupava dello studio delle epidemie (tifo, colera, peste, ecc.) (**figura 1**). L'epidemiologia è oggi la scienza che studia l'associazione statistica tra l'esposizione ad uno o più fattori di rischio e la frequenza di eventi morbosi che questi possono indurre su una popolazione umana. Per "eventi" si possono intendere sia semplici variazioni di parametri biologici (ad esempio pressione arteriosa, glicemia o altro) che vere e proprie malattie (tumori, malattie cardiovascolari, ecc.).

Gli studi epidemiologici hanno come oggetto popolazioni "naturali", non manipolabili dallo sperimentatore, come è invece il caso per le popolazioni di animali da esperimento. Negli studi di laboratorio i ricercatori inducono esposizioni controllate per tipo, dose e durata, in modo da verificare la capacità di produrre eventi attesi sulla base di ipotesi preesistenti. Inoltre, le popolazioni di animali da laboratorio sono caratterizzate da modesta variabilità interindividuale, che viene ulteriormente ridotta con l'uso di metodiche standardizzate di allevamento o di animali ibridi. Lo scopo di questi studi è quello di avere individui "uguali" sotto tutti gli aspetti, escluso quello dell'esposizione indotta nel corso dell'esperimento. Variazioni degli "eventi" negli animali esposti rispetto ai non esposti saranno quindi attribuibili esclusivamente all'esposizione.

Al contrario, la variabilità interindividuale nelle popolazioni su cui opera l'epidemiologo è di solito

Figura 1

Uno dei primi epidemiologi del mondo: **il Prof.**

Alessandro Lustig, triestino (1857-1937) direttore dell'Istituto di Patologia Generale di Firenze. Il suo articolo "Su centottanta casi di peste bubbonica trattati a Bombay nel 1888 con il siero dell'istituto di Patologia" è uno dei primi esempi di ricerca epidemiologica applicata.



molto grande. Inoltre, nella maggior parte dei casi, "l'esposizione" non può essere indotta a piacere dallo sperimentatore, ma è invece "naturale", e come tale non manipolabile.

Il metodo epidemiologico, come quello sperimentale, si basa sul "contrasto" fra gruppi d'individui esposti e gruppi di non esposti ad un determinato fattore in studio. Nelle popolazioni umane questi gruppi di soggetti non differiscono solo per l'esposizione in esame, ma anche per altri parametri: se questi a loro volta sono associati a malattia, non sarà facile capire il ruolo dell'esposizione in studio nel determinare la stessa malattia; infatti, questo potrà essere "confuso" perché dipendente da cause diverse. Questo fenomeno, tipico degli studi d'epidemiologia osservazionale, prende il nome di "confondimento", e deve essere risolto con tecniche statistiche complesse.

L'epidemiologia "clinica" si occupa della risposta di popolazioni umane alla terapia farmacologica. L'epidemiologia "descrittiva" si occupa invece della rilevazione di eventi patologici "naturali" in una popolazione. L'epidemiologia "analitica" studia le correlazioni tra esposizione a determinate noxae (chimiche, fisiche o biologiche) ed eventi di malattia.

Un modello di studio epidemiologico con caratteristiche simili agli studi sperimentali è rappresentato dai trial (in inglese prova, si legge tra-i-al) randomizzati (da random, a caso). Un esempio di trial randomizzati sono gli studi clinici per la valutazione dell'efficacia di terapie. In questi studi è necessario identificare due popolazioni omogenee (**figura 2**) da

Figura 2

TRIAL RANDOMIZZATI. In un trial randomizzato è necessario:

1. IDENTIFICARE DUE POPOLAZIONI DA APPAIARE
2. DEFINIRE UN MARCATORE DI EFFETTO

appaiare secondo criteri quanto più possibile dettagliati (**figura 3**). Per evitare errori l'attribuzione di un soggetto al gruppo dei "trattati" o al gruppo placebo viene affidata all'uso di numeri casuali (randomizzazione): in tal modo, ciascun individuo ha la stessa probabilità di entrare nell'uno o nell'altro gruppo. Così facendo non annulliamo la variabilità interindividuale, ma evitiamo selezioni arbitrarie fra i due gruppi nella distribuzione delle variabili confondenti.

Dopo aver distribuito i soggetti a caso tra i due gruppi, nel gruppo di controllo si procede alla somministrazione di un "placebo" uguale per aspetto al farmaco del gruppo dei trattati (**figura 4**). Un altro importante accorgimento per ridurre la possibilità d'errore è il cosiddetto cross-over (**figura 5**). Quando si comincia un trial clinico è necessario definire un marcatore di effetto (sulla base di informazioni scientifiche sulla malattia che si vuole studiare) (**figura 6**) e definire una opportuna dimensione del campione ("studio di potenza" calcolato con metodi statistici sulla base delle dimensioni % dell'effetto che si pensa di raggiungere e della variabilità del marcatore scelto per lo studio) (**figura 7**). I trial randomizzati si usano spesso nello studio clinico di farmaci o di trattamenti preventivi.

Un esempio interessante di studi epidemiologici è rappresentato dai cosiddetti "studi geografici" (**figura 8**), nei quali si cerca di capire in una certa popolazione se un agente presente in quel territorio e non altrove è responsabile di una certa patologia.

Figura 3 **IDENTIFICAZIONE DI POPOLAZIONI APPAIATE**

- Definizione dei caratteri antropometrici di appaiamento (ad es.: età, sesso, razza, cultura, peso)
- Definizione di criteri medici di appaiamento (ad es.: pressione arteriosa, parametri ematoclinici, patologia simile (ad es. tumori), ecc.

Figura 4
Origine del termine "**placebo**". Placebo Domino in regione vivorum (canto liturgico per il culto dei morti). Middle English "a placebo" = "un tirati su", sollievo di scarso merito

Figura 5
Cross-over: all'inversione del trattamento con placebo tra i due gruppi l'effetto deve scomparire

Figura 6
Definizione di un **marcatore biologico**. Un marcatore biologico è:

- qualunque fattore possa identificare un effetto del trattamento
- ad es.: sopravvivenza, riduzione della pressione, riduzione della colesterolemia, ecc.

Figura 7
Identificazione della dimensione del campione sperimentale: studio di potenza

- Studio della variabilità statistica interna del campione
- Ipotesi di una differenza tra trattati e controlli (ad es.: 20%)
- Identificazione di un campione di grandezza sufficiente da rifiutare l'ipotesi 0 (nessuna differenza tra gruppi) quando la variabilità della popolazione è uguale a quella teoricamente prevista

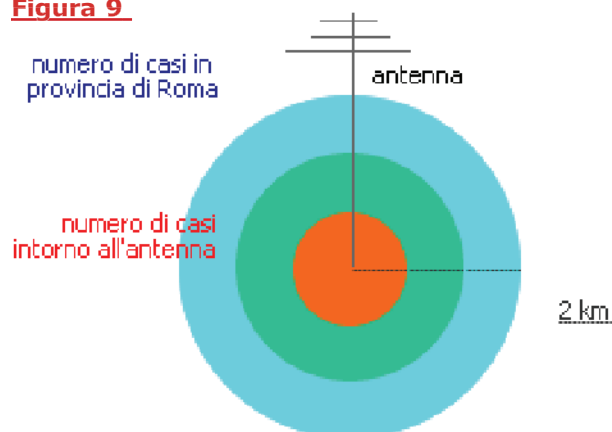
Figura 8
Studi geografici: in uno studio geografico si studia la differenza di incidenza di una malattia in una popolazione esposta ad un agente X rispetto a controlli non esposti

Discuteremo un esempio di questi studi relativo all'effetto presunto leucemizzante dell'esposizione ad onde elettromagnetiche ad alta frequenza. Le onde a bassa frequenza in alcuni studi sono state indicate come una possibile causa di leucemia infantile. In questo caso l'esposizione era relativa a onde radio ad alta frequenza (la radio vaticana) in una zona intorno a Roma (Cesano, Lazio) dove era stata segnalata un'alta incidenza di leucemia. Si sono quindi misurate le incidenze di leucemia in una serie d'aree a distanza variabile dell'antenna trasmittente e si sono confrontate con quelle di una popolazione di riferimento (in questo caso la popolazione della città di Roma) (**figura 9**).

Il numero di soggetti con leucemia attesi nella popolazione esposta di Cesano (calcolato sulla base della frequenza di leucemia nella popolazione di riferimento) era di 0.16, 0.86 e 2.6 partendo dall'anello interno vicino all'antenna e muovendosi verso l'esterno (**figura 10**). I casi osservati erano invece 1, 2 e 5. Come dimostra la **figura 11** il rischio relativo (RR: rapporto tra la frequenza osservata e la frequenza attesa) era assai maggiore a 1 (RR = 1 significa nessun aumento del rischio) ed aumentava avvicinandosi all'impianto di trasmissione. La conclusione dei ricercatori è che, nonostante i piccoli numeri, il rischio di sviluppare leucemia intorno all'impianto era significativamente aumentato.

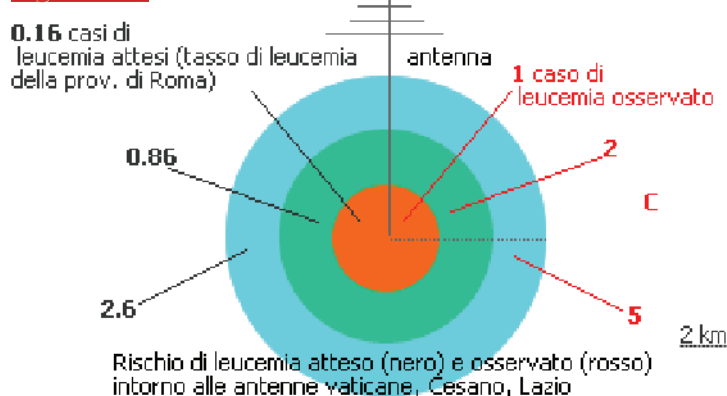
Non tutte le ricerche epidemiologiche si possono fare con trial randomizzati, accettabili solo quando l'esposizione ha ipotetici effetti protettivi (associazione

Figura 9



Rielaborato da dati di Biggeri et al., *Am. J. Epidem* 155, 1996-1103, 2002

Figura 10



Idem

Figura 11

RR= Rischio Relativo= casi osservati/casi attesi

Zona 1 (0-2 km)	Casi di leucemia attesi	0.16	
	Casi di leucemia osservati	1	RR: 6.06
Zona 2 (2-4 km):	Casi di leucemia attesi	0.86	
	Casi di leucemia osservati	2	RR: 2.3
Zona 3 (4-6 km):	Casi di leucemia attesi	2.6	
	Casi di leucemia osservati	5	RR: 1.88

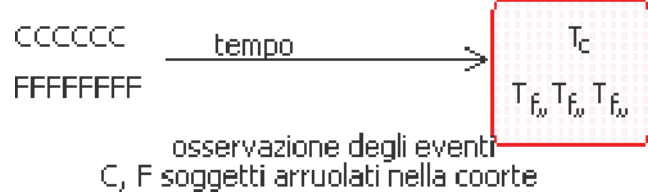
Idem

negativa con la malattia). Per rispondere alla maggior parte dei quesiti epidemiologici rimangono quindi le tecniche osservazionali.

Molto utilizzati sono gli studi di "coorte", nei quali si seguono popolazioni nel tempo cercando di identificare effetti legati all'esposizione ad un agente determinato, in riferimento ad una popolazione di controllo non esposta.

Uno schema esplicativo di uno studio osservazionale di tipo "coorte prospettica" è sintetizzato nella **figura 12**. Esempio: si vuole verificare l'eventuale associazione fra esposizione a fumo di sigaretta ed incidenza di tumori del polmone. Lo sperimentatore identifica un gruppo di soggetti fumatori e di controlli al tempo 0 (indicati con CCCCCC e FFFFFFFF nella **figura 12**). Nel corso di un tempo determinato (che è definito "follow up", perché i soggetti vengono seguiti (followed ed ha una durata variabile in funzione del tipo d'evento che si vuol misurare, in questo caso almeno di 30 anni) lo sperimentatore controlla se si sono verificati dei casi di malattia (in questo caso tumori del polmone, indicati con TC o Tf nel quadrato a destra della **figura 12**, se appartengono a controlli o a fumatori). Nei soggetti esposti si sono verificati 3 casi di tumore del polmone in 30 anni e 1 caso nei controlli. Il disegno dello studio è di tipo prospettico: l'osservatore "attende" che l'esposizione (il fumo di sigaretta) produca una serie d'eventi di malattia misurabili (i tumori del polmone). In uno studio di coorte il tempo deve essere sufficientemente lungo

Figura 12
Schema di uno studio di coorte prospettico



perché l'evento si verifichi (ad es. anni o decenni per i tumori); la coorte deve essere abbastanza grande affinché l'evento sia sperimentalmente misurabile (in questo caso migliaia di soggetti) e l'età della coorte dev'essere compatibile con la patologia osservata (in questo caso adulto-anziana). Ciò richiede una grande pazienza e un alto costo, ma spesso è l'unico modo per sapere se una variabile ambientale ha un effetto su una popolazione (ad esempio, è vero o non è vero che la diossina tetraclorurata ha provocato un aumento dei tumori sulla popolazione di Seveso?).

Una variante di questo tipo di studio è rappresentato dalla coorte retrospettiva (figura 13). In questo caso si parte da un gruppo di soggetti con una patologia che si suppone legata ad una esposizione (ad esempio la leucemia da benzene nei calzaturifici) e si ricostruisce l'esposizione dei controlli e degli esposti nel passato, determinando se l'esposizione di chi ha contratto malattia è più alta rispetto a chi non l'ha contratta. In questo studio (figura 14) sugli effetti del benzene sull'incidenza della leucemia in funzione dell'esposizione, si è preso come riferimento l'incidenza di leucemia della popolazione di Firenze, negli stessi anni e per quella classe d'età. Se gli esposti avessero avuto un rischio nullo, l'incidenza di leucemia sarebbe stata la stessa dei controlli (Standardized Mortality Ratio, $SMR = 1$). Il benzene viene trasformato nel metabolita tossico benzochinone dalle monossigenasi e dalle perossidasi.

Figura 13

Studio di coorte retrospettiva sulle relazioni tra benzene e leucemia nei calzaturieri

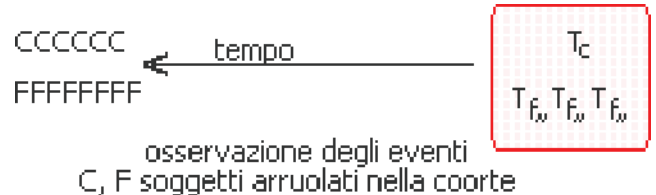


Figura 14

Leucemia ed esposizione al benzene nei calzaturieri. **Calcolo dello SMR*** (Standardized Mortality Ratio, per leucemia o malignità ematopoietiche): rapporto tra l'incidenza di casi nella popolazione di esposti rispetto alla popolazione generale della stessa area.

* Nessun effetto: $SMR = 1$

Seniori Costanini et al., Scand J Work Environm Health 29, 51-55, 2003

Queste reazioni metaboliche avvengono in vari organi e nel midollo osseo, il che spiega l'effetto leucemizzante. Il benzene è stato associato ad alterazioni cromosomiche, anemia aplastica e leucemia in numerosi studi sperimentali. Nello studio retrospettivo sul benzene delle **figure 14-17** sono stati utilizzati i dati di circa 1600 soggetti, di cui si è ricostruita la storia nei 50 anni precedenti. Come dimostra la figura 15 i calzaturifici sono stati classificati secondo 4 livelli di esposizione, sulla base delle condizioni di lavoro e di ventilazione dei locali della fabbrica (Rangoni, Firenze). Per ciascuna delle coorti esposte a queste quattro concentrazioni si è calcolata l'incidenza teorica di leucemia sulla base della incidenza della malattia nella popolazione fiorentina. Il rapporto tra numero di leucemie osservata ed attesa, o SMR, è riportato nella **figura 16**, con una stima d'errore (limiti di confidenza C.L.), legata al fatto che la valutazione di frequenza di un determinato evento ha sempre un margine d'errore. Quando i limiti di confidenza dell'errore non includono il valore di $SMR = 1$, per convenzione si dice che le differenze sono significative. In questo caso l'esposizione a 200 ppm aveva un effetto significativo. Interessante è anche la risposta dose-effetto (**figura 17**), che può rafforzare le conclusioni generali di un'associazione positiva tra variabili.

Un ulteriore modello di indagine epidemiologica è lo studio caso controllo o retrospettivo. In questo caso viene identificato un certo numero di soggetti con una determinata patologia (casi). Vengono anche identificati soggetti (controlli) che non hanno

Figura 15

Studio di coorte sulle leucemie (L) in relazione alla esposizione a benzene

Esposizione al benzene	Numero osservato di L	Numero atteso
<40 ppm-anno*	4	3.3
40-99 ppm-anni	1	0.62
100-199 ppm-anni	3	1.43
>=200	6	1.23

* Sommatoria della concentrazione di benzene media nell'ambiente per ogni anno di permanenza in quella mansione
Seniori Costanini et al., Scand J Work Environm Health 29, 51-55, 2003

Figura 16

Studio di coorte sulle malattie ematologiche

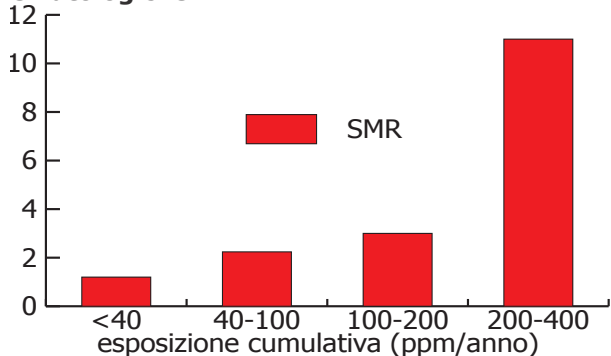
Esposizione al benzene	SMR*	CL
(numero osservato/ numero atteso)		(limiti di confidenza)
<40 ppm-anno*	1.2	0.3-3.1
40-99 ppm-anni	1.6	0.04-9
100-199 ppm-anni	2.1	0.4-6.1
>=200	6	1.8-10

* SMR: standardized mortality ratio = rapporto di mortalità standardizzato

Idem

Figura 17

Relazione tra esposizione al benzene e neoplasie ematologiche



Idem

la malattia in esame e appartengono alla stessa popolazione dei casi. Lo studio caso-controllo serve a determinare se l'esposizione dei casi ad un evento è significativamente maggiore rispetto ai controlli.

Come illustra la **figura 18** l'epidemiologo ricostruisce nel periodo precedente all'evento patologico l'esposizione ad un supposto agente causale.

Un esempio di quest'approccio è riportato nella **figura 19**, relativa ad uno studio sulla dieta precedente come fattore di rischio per l'infarto. Nello studio è stato usato con un questionario dietetico che ricostruisce le abitudini alimentari dei soggetti (**figura 20**). Sulla base di una serie di studi precedenti i fattori di rischio (molta carne ad esempio) o di protezione (molta verdura ad esempio) sono stati raggruppati in due classi alimentari distinte e si è studiata in queste due classi la frequenza di soggetti infartuati (**figura 21**). Così facendo si determina il cosiddetto Odd Ratio (OR, rapporto delle probabilità), di sviluppare l'evento tra la dieta a basso rischio ed una ad alto rischio. Se l'OR è 1, le variabili di rischio supposte non hanno un effetto (**figura 22**). Anche in questo caso l'odd ratio ha dei limiti di confidenza (CL); quando non includono il valore 1, le variazioni di odd ratio sono considerate significative.

Figura 18

Schema di uno studio caso controllo

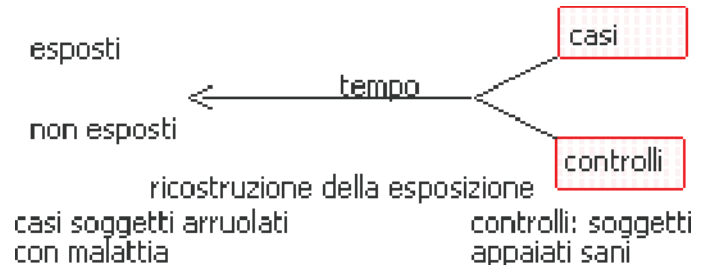


Figura 19

Esempio di uno studio caso controllo: effetto della dieta sulla incidenza di malattie cardiovascolari nella popolazione spagnola:

- casi (n=171). Soggetti colpiti da infarto
- controlli (n=171). Soggetti senza infarto, appaiati ai casi per le altre caratteristiche (età, sesso, fumo, classe sociale, residenza, ecc.)

Martin Gonzales et al., Europ J Nutr 41, 153-159, 2002

Figura 20

Questionario dietetico sul consumo di carne, vino, farinacei, pesce, olio, frutta, verdura
Scala di consumi da 1 a 5 per ogni alimento

Figura 21

Studio caso controllo su dieta e malattie cardiovascolari

Poca carne, molta frutta, verdura, olio, vino (a)

Molta carne, poca frutta, verdura, olio, vino (b)

ricostruzione della dieta

Figura 22

Risultati dello studio di Martin Gonzales et al.:

- odd ratio di infarto (rapporto della frequenza di infarto nel gruppo a rischio (a, alta carne, bassa verdura) rispetto al gruppo b
- 0.55 (limiti di confidenza, CL, 0.42-0.73)
- il dato è significativo quando i CL non includono 1.
- se Odd ratio=1, non c'è differenza di incidenza della malattia in funzione della variabile scelta

Un altro esempio di studio caso controllo è riportato nella **figura 23**. In questo caso si studiano retrospettivamente le abitudini in relazione al fumo dei soggetti che hanno sviluppato un tumore polmonare (casi) e dei controlli (**figura 24**). L'OR (**figura 25**) si ottiene facendo il rapporto della frequenza di tumori polmonari nei fumatori (9.6×10^{-5}) rispetto a quella dei non fumatori (1.5×10^{-5}). Il valore OR di 6.27 significa che in questo caso la frequenza del tumore polmonare è circa sei volte maggiore nei fumatori che nei non fumatori. Gli studi caso controllo hanno il difetto che si possono condurre solo reclutando un numero sufficientemente grande di casi (cosa difficile per le malattie rare).

È inoltre necessario procedere all'appaiamento con controlli che abbiano le stesse caratteristiche dei casi, a parte quella oggetto dello studio (ad esempio il cancro polmonare). Gli studi epidemiologici sono concettualmente semplici, danno molte informazioni utili e facilmente applicabili, ma è necessario che le classificazioni siano fatte con estrema accortezza. Infatti qualunque classificazione erronea, in particolare su piccoli gruppi di soggetti, porta ad importanti errori che possono inficiare il risultato dell'intero studio. Nonostante le limitazioni, la lentezza ed il costo, solo l'epidemiologia può dare informazioni sull'effetto di noxae chimiche, fisiche e ambientali sulle malattie umane.

Figura 23

Fumo di sigaretta e tumori polmonari: un esempio di studio CASO-CONTROLLO

- Reclutamento dei casi e appaiamento con i controlli
- Ricostruzione della esposizione nel periodo precedente (10-30 anni)
- Numerosità: 25500

Figura 24

Esempio di uno studio caso-controllo su tumori polmonari e fumo

	Fumo	Non fumo	Totale
Casi di tumore	12	2	14
Controlli	12438	12998	25436
Totale	12500	13000	25500

Figura 25

Risultati. Incidenza totale dei tumori polmonari:

- $12/25500 = 6.6 \times 10^{-5}$
- casi nei fumatori: $12/12500 = 9.6 \times 10^{-5}$
- casi nei non fumatori: $2/13000 = 1.53 \times 10^{-5}$

Odd Ratio* (OR): $9.6/1.53 = 6.27$

rox

lezione n. 13

Epidemiologia descrittiva

L'epidemiologia descrittiva è quella specializzazione dell'epidemiologia che descrive lo stato di salute delle popolazioni. È una parte importante dell'epidemiologia, perché permette di identificare quali sono i fattori che provocano alterazioni delle condizioni di salute (ad es. variazioni della dieta, dell'ambiente e delle condizioni di vita). Queste informazioni sono fornite dagli studi epidemiologici "geografici" o "descrittivi".

Un esempio di studi geografici sono gli studi di mortalità che descrivono l'incidenza degli eventi di morte/100000 abitanti residenti. Ad esempio, la mortalità in Italia è in costante diminuzione negli ultimi decenni (**figura 1**).

Altro parametro importante è la cosiddetta speranza di vita, cioè il numero di anni che si ottiene calcolando l'età media di morte di una popolazione. Anche questa è variabile da un paese all'altro (**figura 2**) e da un'epoca all'altra (**figura 3**) ed è in continuo aumento in Italia ed in Toscana in particolare. L'età massima certificata di vita umana è di circa 120 anni. La mortalità percentuale è invece la frequenza di una certa causa di morte rispetto alle altre.

La **figura 4** riporta le più importanti cause % di morte in Italia per i due sessi. Per i tumori riportiamo quelli che più frequentemente causano morte nel nostro paese per i maschi (**figura 5**) e per le femmine (**figura 6**). Alcuni tumori hanno una frequenza simile nei due sessi (ad es. quelli del colon e le leucemie) altri differenze importanti (mammella,

Figura 1

Variazioni della mortalità generale in Italia

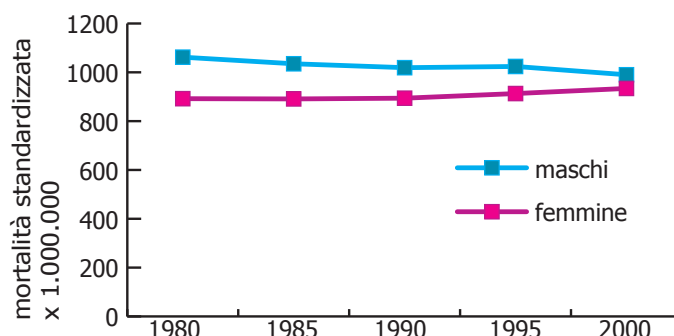


Figura 2

Speranza di vita alla nascita in vari paesi europei (1990)

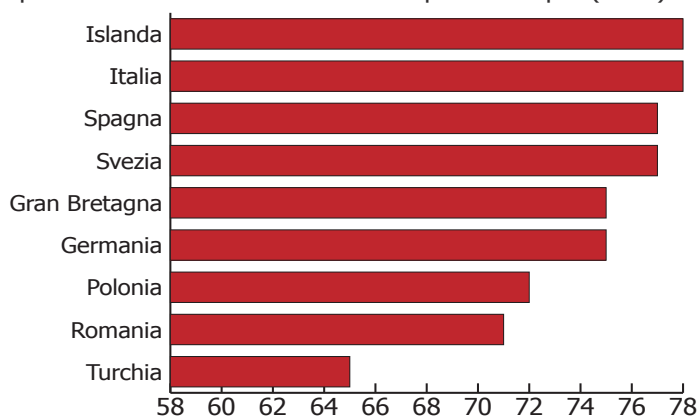


Figura 3

Evoluzione storica della speranza di vita in Europa

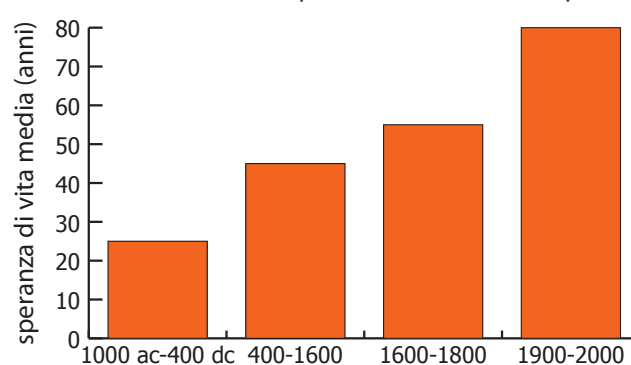
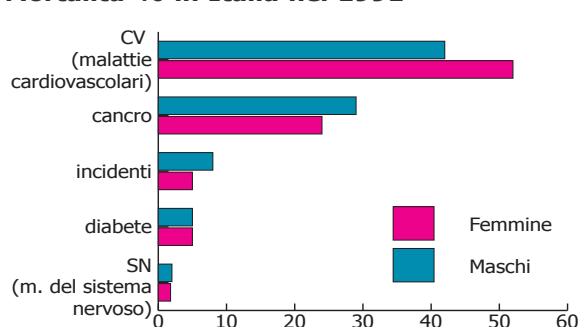


Figura 4

Mortalità % in Italia nel 1991



polmone), sia per ovvie differenze anatomiche sia per abitudini differenti tra i sessi (fumo).

Figura 5
Mortalità % per tumore in Italia, maschi, 1991

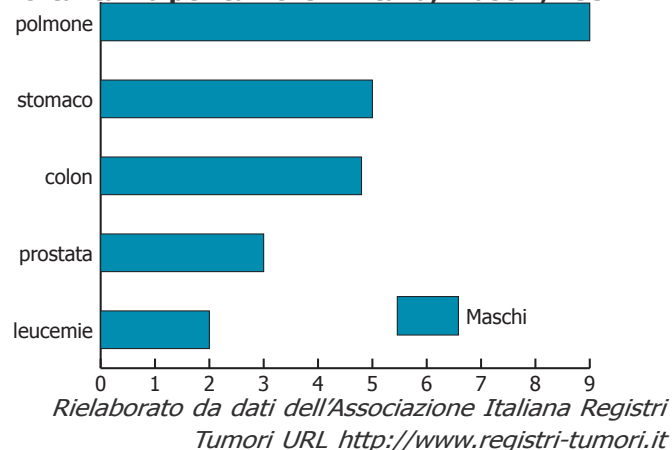
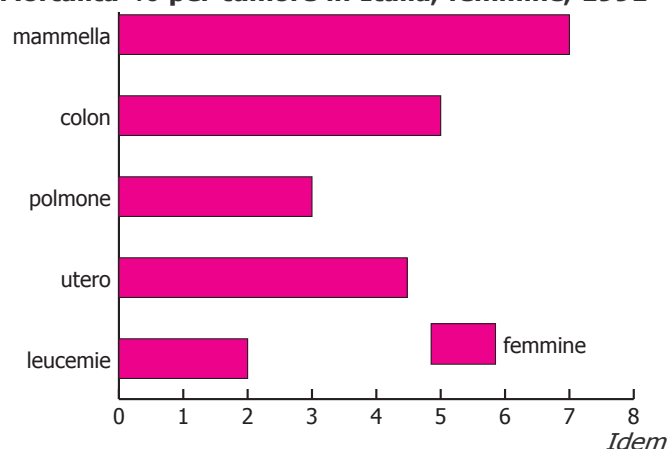
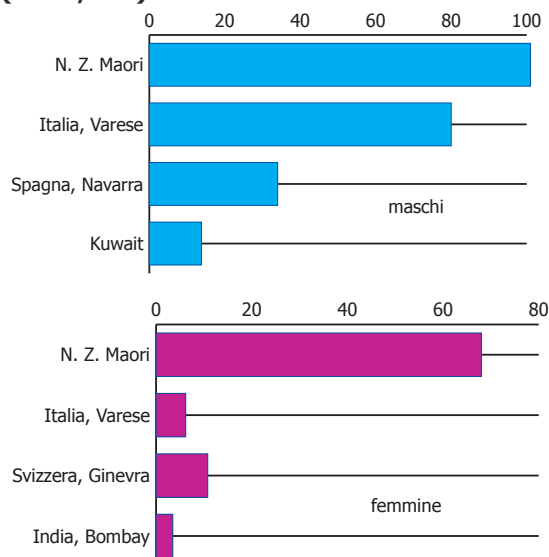


Figura 6
Mortalità % per tumore in Italia, femmine, 1991



Importanti informazioni vengono anche da studi epidemiologici "geografici" internazionali. Essendo gli esseri umani tra loro simili, una forte variazione di una patologia da una popolazione all'altra (come il tumore al polmone, **figura 7**) indica che in una determinata popolazione esistono noxae specifiche (ad esempio il fumo di sigaretta produce tumori polmonari egualmente nei Maori maschi e femmine, entrambi accaniti fumatori). L'incidenza più bassa si osserva in alcune regioni dell'India, per lo stesso motivo.

Figura 7
Incidenza di tumori del polmone nel mondo (x100,000)

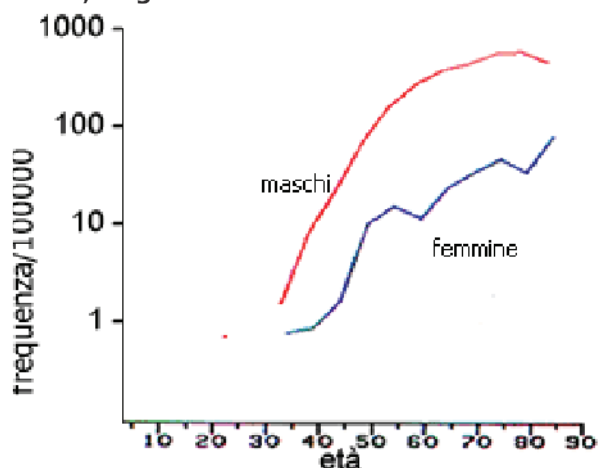


Da dati della International Agency for Research on Cancer (IARC) URL <http://www-dep.iarc.fr>; modificato

L'epidemiologia descrittiva dà anche informazioni sull'incidenza di patologie (ad esempio i tumori) per ogni fascia d'età (**figura 8**). Sappiamo, ad esempio, che il tumore del polmone è infrequente prima di trenta-quarant'anni di vita; smettere di fumare prima di quarant'anni farebbe quasi scomparire questa patologia.

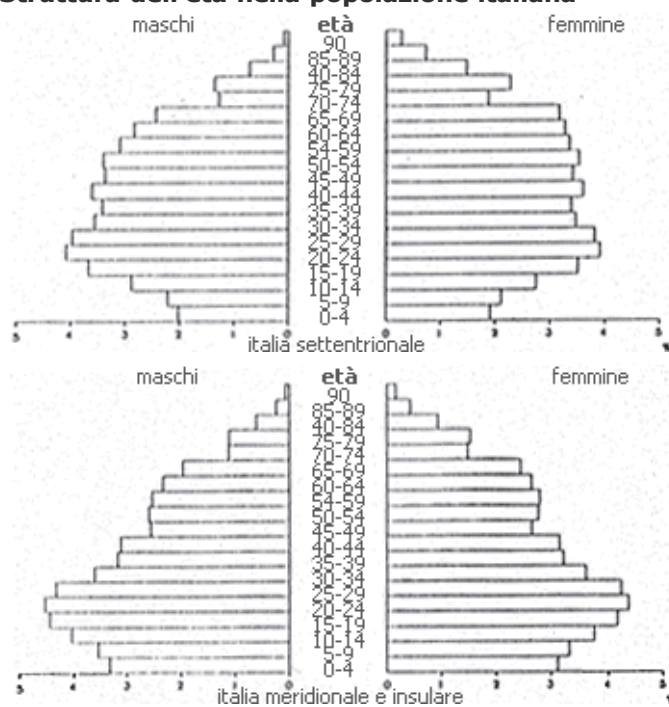
Informazioni importanti si ottengono anche confrontando la mortalità dovuta ad una certa malattia in diverse regioni dello stesso paese, misurando i cosiddetti SMR (standardized mortality ratio) che misurano la mortalità di una certa regione rispetto alla mortalità di un paese (es. l'Italia) utilizzando per il calcolo della mortalità "normalizzata", una serie di formule che correggono i dati grezzi di mortalità con fattori che tengono conto delle variazioni prodotte sulla mortalità da variazioni della struttura dell'età nella popolazione stessa. Infatti, poiché la mortalità varia in funzione dell'età, sarebbero comparabili solo popolazioni con una stessa struttura d'età; si rimedia a questo impasse correggendo i dati di mortalità di una popolazione con dei fattori che tengono conto della deviazione dell'età rispetto ad una popolazione standard (tasso di mortalità normalizzata). Per fare confronti significativi tra popolazioni che hanno una composizione diversa è necessario quindi conoscere la "piramide delle età", cioè la struttura di età nella popolazione (che quando è stato coniato il termine aveva aspetto piramidale con molti bambini e pochi vecchi). Quando una popolazione è relativamente giovane (come l'Italia meridionale rispetto alla settentrionale (**figura 9**)) è necessario correggere

Figura 8
Incidenza di tumori polmonari per fasce di età, Italia, Registro di Varese



Da dati della International Agency for Research on Cancer (IARC) URL <http://www-dep.iarc.fr>, modificato

Figura 9
Struttura dell'età nella popolazione italiana



Idem

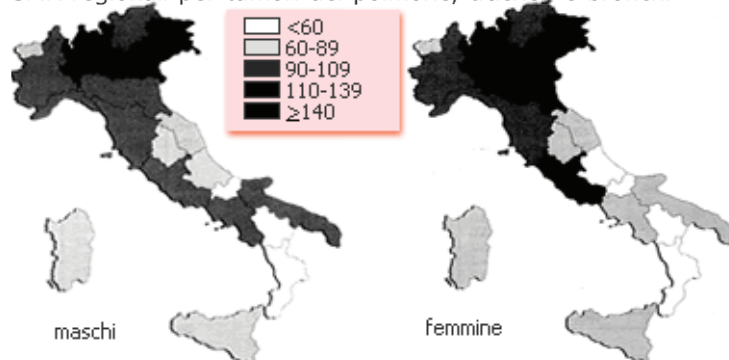
le stime di frequenza complessiva, perché alcune patologie sono meno frequenti in alcune fasce d'età (ad esempio le malattie cardiovascolari o i tumori nei giovani). La **figura 10** mostra la variazione di mortalità standardizzata per tumore del polmone in varie regioni italiane per i maschi e per le femmine.

Particolarmente interessanti sono le variazioni temporali di questi fenomeni. Ad esempio la **figura 11** mostra una riduzione nel tempo dei tumori dello stomaco nei maschi in Italia associata ad una incidenza stabile di infarto miocardico.

Nelle femmine la frequenza d'infarto è invece assai bassa, mentre è equivalente la frequenza di cancro gastrico e del colon (**figura 12**). Diverse sono le cause più frequenti di morte in ogni fascia d'età (ad esempio, le malformazioni e gli incidenti sono la causa principale di morte per i bambini (**figura 13**) e gli incidenti per i giovani maschi (**figura 14**), il fenomeno (**figura 15**) che raggiunge il suo picco tra 15 e 30 anni e aumenta di nuovo nell'età presenile (**figura 16**) non è solo italiano (**figura 17**).

Figura 10

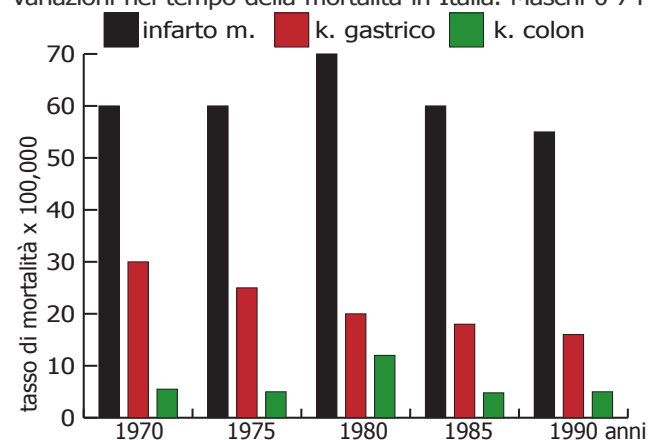
SMR regionali per tumori del polmone, trachea e bronchi



Rielaborato da dati dell'Associazione Italiana Registri Tumori <http://www.registri-tumori.it>

Figura 11

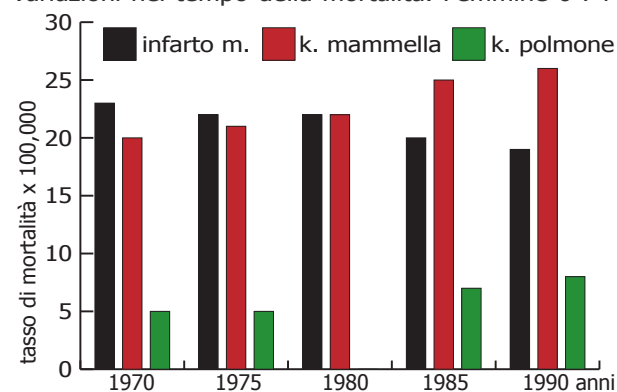
Variazioni nel tempo della mortalità in Italia. Maschi 0-74 a.



Idem

Figura 12

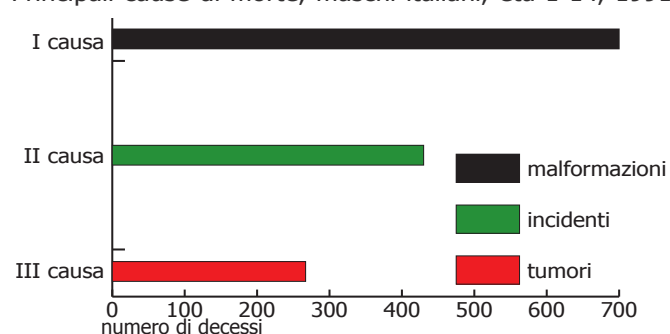
Variazioni nel tempo della mortalità. Femmine 0-74 a.



Idem

Figura 13

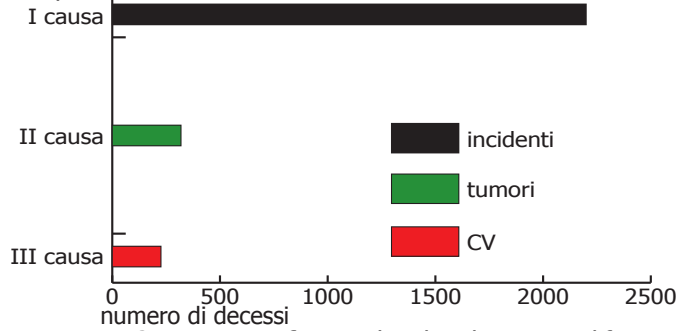
Principali cause di morte, maschi italiani, età 1-14, 1991



Da Osservatorio fumo, alcool e droga, modificato

Figura 14

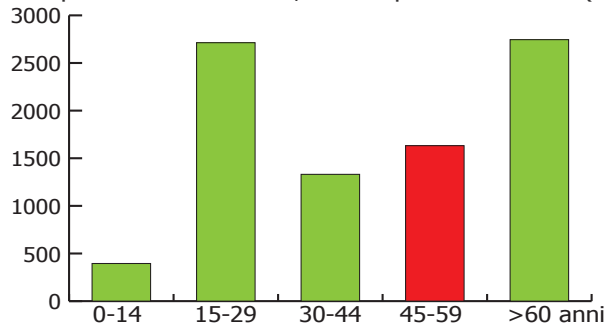
Principali cause di morte, maschi italiani età, 15-24, 1991



Da Osservatorio fumo, alcool e droga, modificato

Figura 15**Figura 16**

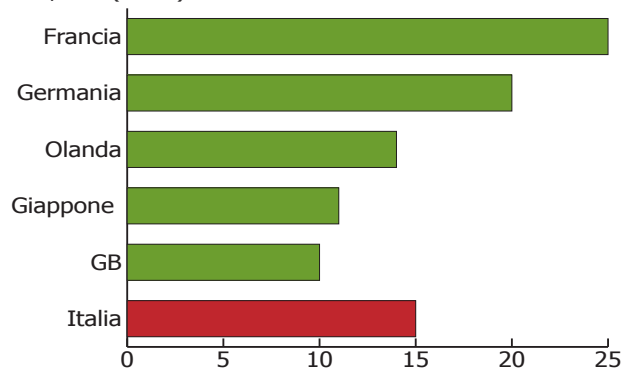
Morti per incidenti in Italia, distinti per classi di età (1987)



Da Osservatorio fumo, alcool e droga, modificato

Figura 17

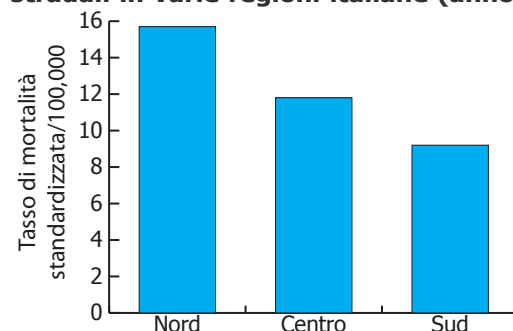
Morti per incidenti in diversi paesi europei, tassi x100,000 (1981)



Idem

Figura 18

Tassi standardizzati di mortalità per incidenti stradali in varie regioni italiane (anno 1980-82)



Idem

In Italia i massimi di mortalità si hanno per i maschi in Veneto, forse per effetto della prevalenza d'alcolismo nei maschi (figura 18). Gli incidenti del traffico sono una variante moderna dei sacrifici umani offerti in antico dai Maia e dagli Atzechi al dio sole (figura 19). Nel caso dell'America centrale i sacrifici dovevano mantenere, con il sangue offerto al dio Chach (figura 20), la fertilità ciclica della terra;

nel caso delle società moderna i sacrifici da traffico mantengono la produttività del sistema economico. La differenza fondamentale è nei numeri (alcuni malcapitati prigionieri nel caso dei Maia, centinaia di migliaia di persone di ogni età e condizione nel caso del traffico).

Dopo i 65 anni le cause principali di morte sono invece le malattie cardiovascolari, i tumori e le malattie respiratorie (figura 21).

In conclusione le cause di morte variano in funzione del sesso, dell'età e del periodo storico. La conoscenza delle cause di morte può fornire strumenti importanti, per migliorare lo stato di salute e per aumentare l'aspettativa di vita.

Per quanto riguarda la popolazione toscana, la mortalità per tutte le cause (principalmente tumori e malattie cardiovascolari) è in costante diminuzione (figura 22), e così pure la mortalità per tumori (figura 23); al contrario l'incidenza dei tumori è in lieve aumento (la forbice tra i due fenomeni è dovuta ai miglioramenti della diagnosi precoce ed alla terapia) (figura 24).

Figura 19
Chichen Itza, 8-13 sec. d.C.



Figura 20
Il dio Chach



Figura 21
Mortalità in Italia dopo i 65 anni

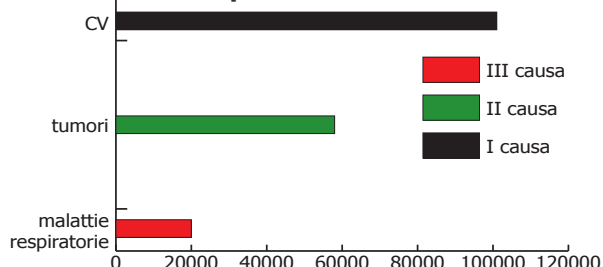
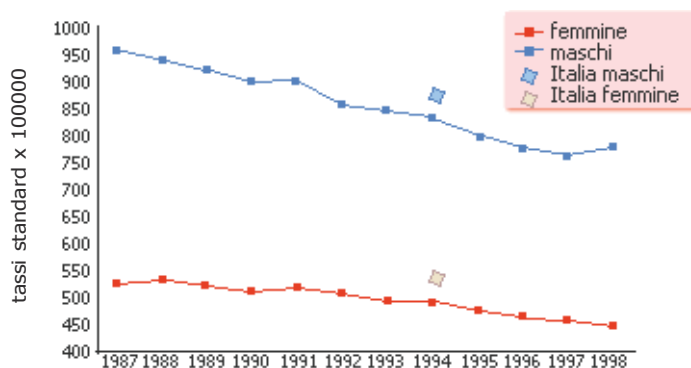
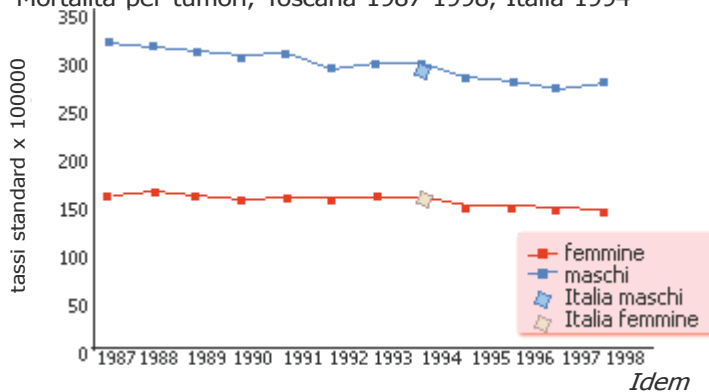


Figura 22
Mortalità per tutte le cause, Toscana 1987-1998, Italia 1994



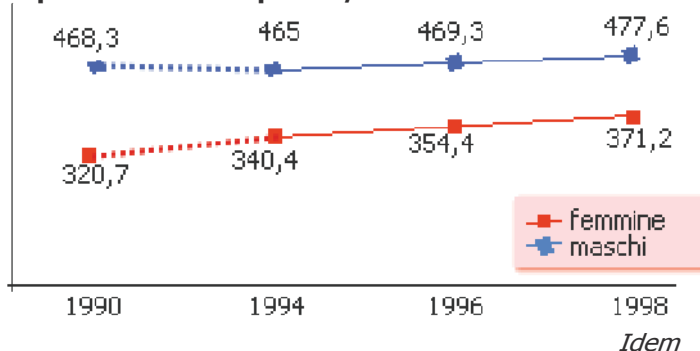
Da Osservatorio fumo, alcool e droga, modificato

Figura 23
Mortalità per tumori, Toscana 1987-1998, Italia 1994



Idem

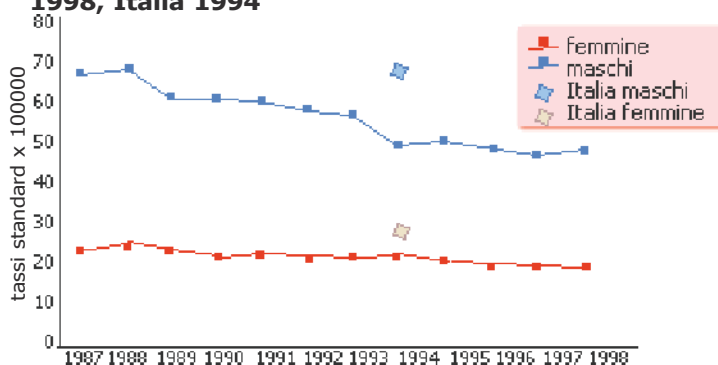
Figura 24
Andamento incidenza tumori. Toscana 1990-1998.
Espressa come frequenza/100.000



Idem

Anche la mortalità per infarto è diminuita per le stesse ragioni (figura 25).

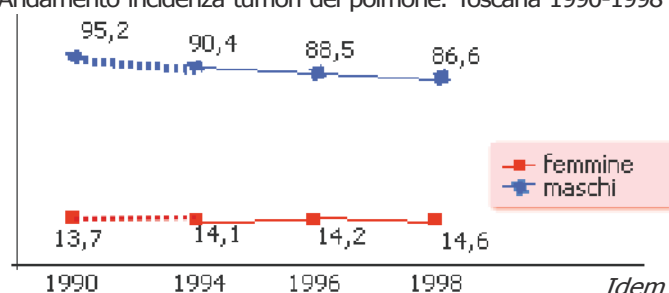
Figura 25
Mortalità per infarto miocardico. Toscana 1987-1998, Italia 1994



Da Osservatorio fumo, alcool e droga, modificato

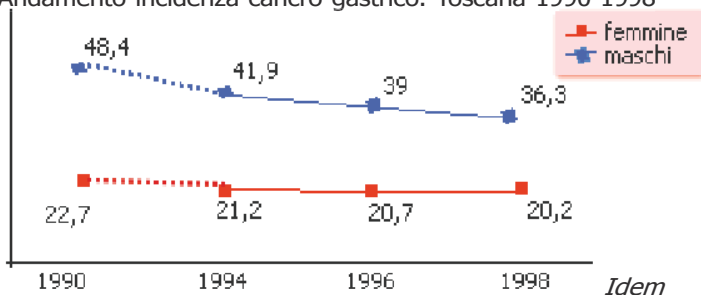
All'interno di questo quadro, l'incidenza dei tumori del polmone (figura 26), dello stomaco (figura 27) e dell'utero (figura 28) è in diminuzione, mentre si nota un certo aumento dei tumori della mammella (figura 29).

Figura 26
Andamento incidenza tumori del polmone. Toscana 1990-1998



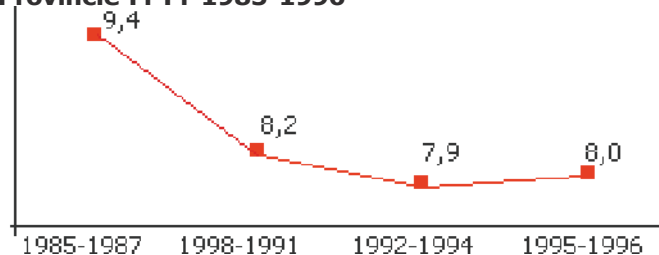
Idem

Figura 27
Andamento incidenza cancro gastrico. Toscana 1990-1998



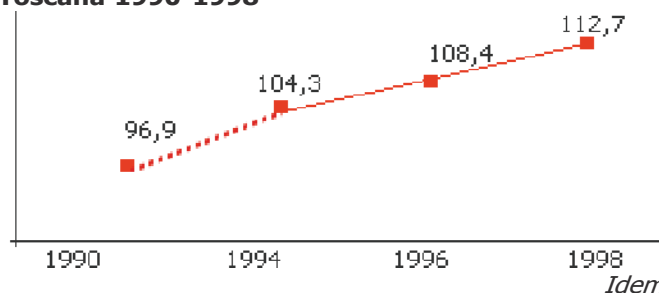
Idem

Figura 28
Andamento incidenza tumori del collo dell'utero. Provincie Fi-Pr 1985-1996



Idem

Figura 29
Andamento incidenza tumori della mammella. Toscana 1990-1998



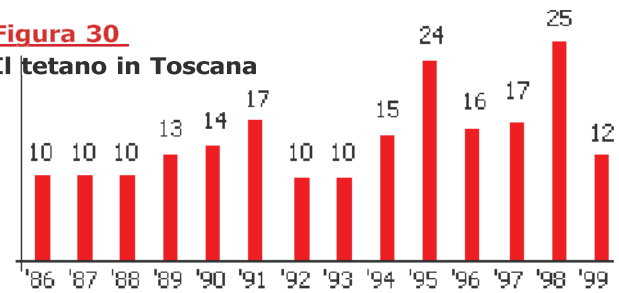
Idem

È invece aumentata l'incidenza di tetano (**figura 30**) e di malaria (**figura 31**), che sarebbero facilmente prevenibili, il primo con la vaccinazione, il secondo con la prevenzione prima e durante i viaggi ai tropici (ad esempio con cloroquina).

Nel complesso la speranza di vita (la quantità di anni che ogni individuo può aspettarsi di vivere sulla base delle stime medie di durata della vita nella popolazione a cui appartiene) in Toscana è molto elevata per entrambi i sessi (**figura 32**) e maggiore rispetto a quella media dell'Italia (**figura 33**).

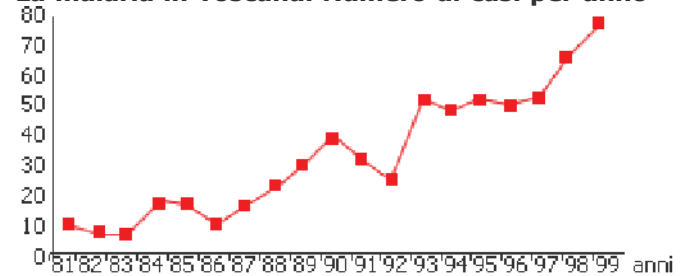
Come spiacevole corollario è aumentato in Toscana il numero dei disabili o parzialmente abili, soprattutto femmine (**figura 34**). La vecchiaia è infatti la causa più frequente di disabilità e siccome la maggior parte dei vecchi è costituita da femmine, l'incidenza di alcune malattie invalidanti (in particolare le malattie muscolo-scheletriche, come l'osteoporosi, frequenti tra le femmine) produce una più alta frazione di disabili nelle femmine anziane.

Figura 30
Il tetano in Toscana



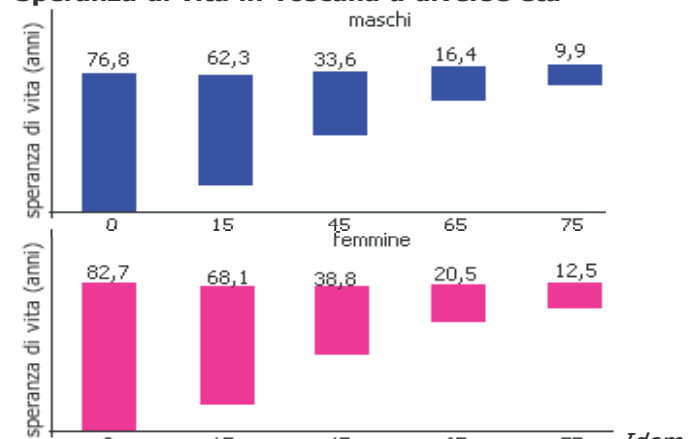
Da Osservatorio fumo, alcool e droga, modificato

Figura 31
La malaria in Toscana. Numero di casi per anno



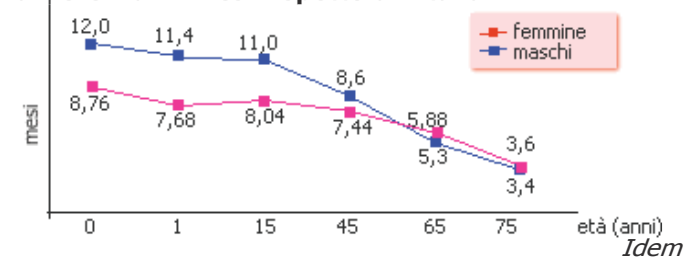
Idem

Figura 32
Speranza di vita in Toscana a diverse età



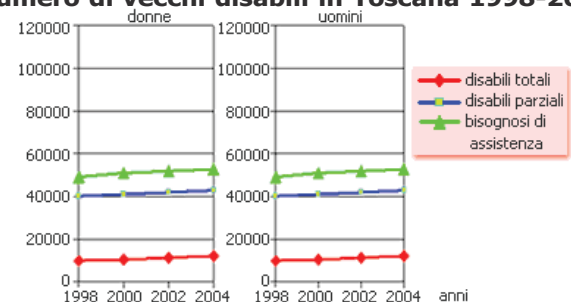
Idem

Figura 33
Speranza di vita in Toscana a diverse età: differenza in mesi rispetto all'Italia



Idem

Figura 34
Numero di vecchi disabili in Toscana 1998-2004



Rielaborato da dati di Buiatti et al., www.irpet.it/storage/agendaallegato/92_Buiatti%2021.2.pdf

rox

lezione n. 14

Sostanze tossiche presenti negli alimenti

Gli alimenti possono essere frequentemente causa di patologia. Le malattie legate all'alimentazione sono dovute a carenze qualitative o quantitative di alcuni nutrienti (ad esempio vitamine, sali minerali, proteine o acidi grassi essenziali) o alla presenza di eccesso di calorie o di un eccesso di altri nutrienti (ad esempio grassi e zuccheri semplici), o a contaminanti presenti negli alimenti, di origine naturale o antropica.

Gli alimenti sono mescolanze di nutrienti e di sostanze non nutritive con effetti complessi sull'omeostasi dell'organismo, che sono oggetto di studio della scienza dell'alimentazione (**figura 1**).

Un primo oggetto di indagine sono le malattie da eccesso e da carenza alimentare (**figura 2**).

Le carenze alimentari sono causa comune di patologia in molti paesi sottosviluppati (nei quali la scarsità delle risorse che assicurano un'alimentazione bilanciata è ancora una causa importante di patologia); la carenza alimentare è collegata alla scarsa aspettativa di vita, in particolare per le donne (le gravidanze e l'allattamento aumentano il fabbisogno di nutrienti, in particolare di vitamine, lipidi e ferro).

Un esempio di malattia da carenza di ferro è riportato in **figura 3**.

Molti oligoelementi devono essere assunti a dosi proprie con la dieta per evitare malattie da carenza. Tuttavia la relazione tra dose ed effetto per gli oligoelementi ha una forma ad U (**figura 4**); è quindi

Figura 1

Il cibo è una miscela complessa di: sostanze non nutritive

- sostanze naturali
- additivi
- contaminanti
- prodotti che derivano dal processamento dei cibi

sostanze nutritive

- carboidrati
- proteine
- grassi
- fibre
- minerali
- vitamine

Figura 2

Effetti tossici legati all'alimentazione (dovuti a sostanze nutritive)

carenza

- ipovitaminosi
- carenza di fibre
- carenza di minerali

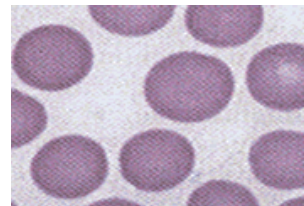
eccesso

- ipervitaminosi
- eccesso di calorie
- eccesso di grassi

Figura 3

Anemia da carenza di ferro

eritrociti normali



anemia microcitica ipocromica: eritrociti piccoli e pallidi



necessario assumere dosi appropriate per non avere effetti da sovradosaggio, in particolare di oligoelementi tossici ad alte dosi (come cobalto, zinco, rame e ferro).

Un eccesso di ferro può provocare ad esempio ulcerazioni gastrointestinali, acidosi metabolica e danno epatico.

Una antica malattia da carenza è la pellagra (**figura 5**) causata dalla carenza di niacina. Il mais americano nel XVI secolo diventò popolare in molte zone d'Europa; in Italia la polenta è stata per secoli il cibo abituale di contadini poveri e di mezzadri. Nel XVIII secolo fu descritta una malattia che sembrava associata al consumo di mais, caratterizzata da piaghe arrossate sulla pelle, diarrea, debolezza e confusione mentale, che fu definita "Pellagra" (1771). Successivamente (XIX sec.) la malattia fu descritta in varie parti del mondo. Oggi la pellagra è presente in Sudafrica, Egitto e India. I popoli indigeni dell'America centrale non avevano la pellagra, perché trattavano il mais con "lime" (calcio ossido), ancora usato nelle tortillas messicane. L'ambiente alcalino libera la niacina dal mais che può essere assimilata facilmente (inoltre i Maya mangia(va)no anche fagioli con le tortillas!!).

Nel corso di 10,000 anni di evoluzione dell'agricoltura gli alimenti con effetti tossici sono stati identificati e progressivamente eliminati. Ma anche gli alimenti selezionati per le alte proprietà nutritive possono contenere contaminanti di origine fungina. Molti componenti minori degli alimenti possono provocare allergie o tossicità e sono ancora solo in parte identificati (**figura 6**).

Figura 4
Curva dose-risposta individuale

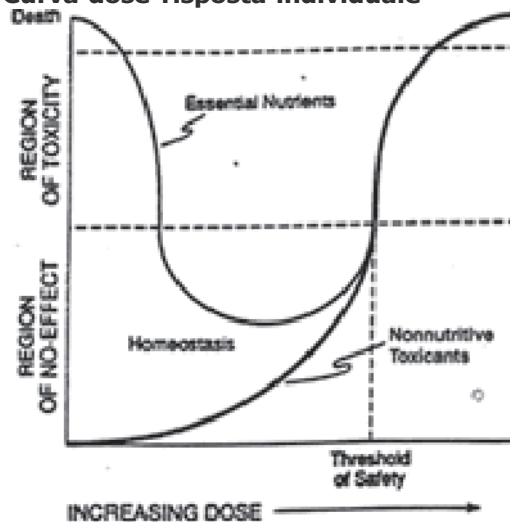


Figura 5
Una vecchia foto di pellagra



Figura 6
Sostanze non nutritive presenti in vari alimenti

Alimento	N. di composti identificati
Succo di arancio	250
Banana	325
Pomodoro	350
Vino	475
Caffè	625
Manzo cotto	625

Alcune di queste sostanze possono agire da antinutrienti (gozzigeni), altre possono essere tossiche (cicasine). Sono sostanze che in molti casi vitali per le piante

L'*Amanita phalloides* (**figura 12**) è il fungo più tossico presente in zone temperate e contiene due classi di tossine peptidiche, la amanitine (**figura 13**) e la falloidina (**figura 14**); le prime sono potenti inibitori della RNA polimerasi, la seconda è un tossico di membrana selettivo, responsabile della necrosi epatica. Sono sufficienti 100 g di peso umido di amanita falloide (circa 70 mg di falloidina) per uccidere un uomo adulto con necrosi epatica fulminante.

Figura 12
Amanite, potenti inibitori
Della RNA polimerasi

Figura 13
Strutture delle amanitine

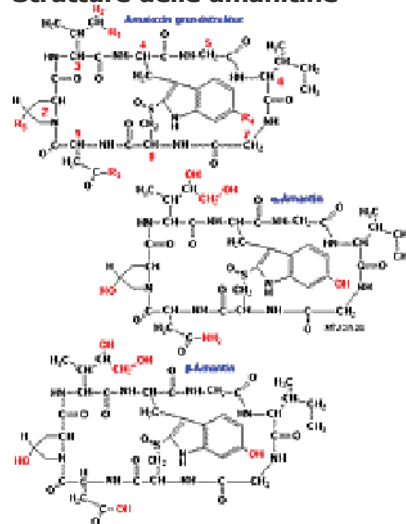


Figura 14
Struttura della falloidina

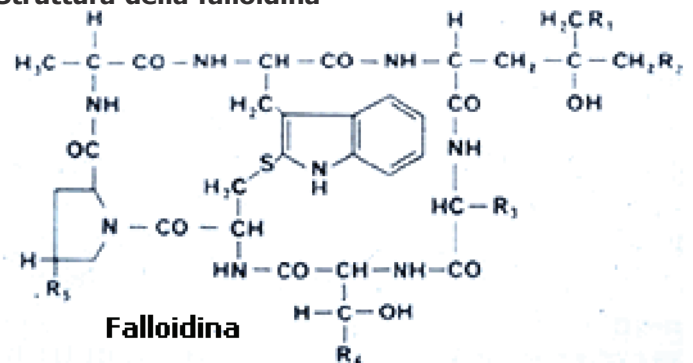


Figura 15
Fattori tossici contenuti in alimenti di origine vegetale

Sostanze	Sorgente	Effetto
Inibitori enzimatici	Grano e fagioli crudi, frutta acerba	Malassorbimento
Lectine	Legumi, patate, germe di grano	Depressione della crescita
Isotiocianato	Cavolo, mostarda	Ipotiroidismo Interferenza con l'assorbimento dello Iodio

Nella **figura 15** sono riassunti principi tossici presenti in alcuni alimenti di origine vegetale. Le lectine e gli inibitori enzimatici vengono inattivati dalla cottura degli alimenti, che migliora le qualità nutritive di alimenti vegetali (oltre a ridurre la carica batterica ed inattivare alcune tossine termolabili). L'isotiocianato è un composto tossico per la tiroide presente in alcuni alimenti comuni, anch'esso parzialmente volatile (odore di cavolo!).

Importanti contaminanti degli alimenti con effetti tossici e cancerogeni sono le micotossine. Le micotossine si formano tutte le volte che si creano condizioni favorevoli alla crescita di muffe e funghi, per esempio senza refrigerazione in un clima umido. Alimenti facilmente contaminabili sono prodotti vegetali (cereali, mais, frumento, riso, orzo, segale), semi oleosi (arachidi, girasole), frutta secca, legumi, spezie, caffè e cacao. Le micotossine vengono assunte dagli animali domestici e passano nel sangue e nella carne. Da questi alimenti carnei e dal latte passano infine all'alimentazione umana, che può anche essere contaminata direttamente da micotossine presenti in alimenti vegetali (figura 16).

Un caso particolare di contaminazione da micotossine è quello della segale cornuta, o *Claviceps purpurea*, contaminante del grano e della segale (figura 17) che causava vere e proprie epidemie (ergotismo) con necrosi delle estremità, aborto e allucinazioni, spesso interpretate nelle giovani donne come possessione diabolica. Gli ultimi episodi sono avvenuti nel regno Unito nel 1927 e nel 1951. Le intossicazioni da tricoteceni (figura 18) hanno provocato epidemie di agranulocitosi ed emorragie in Russia anche in questo secolo. Altrettanto può dirsi delle ocratossine, responsabili in epoca recente di intossicazioni in Jugoslavia, Romania e Bulgaria.

Figura 16
Interazione tra micotossine e uomo



Figura 17
Suoli poveri e climi freddi favoriscono la crescita della *Claviceps purpurea* sulle spighe di segale che contiene:



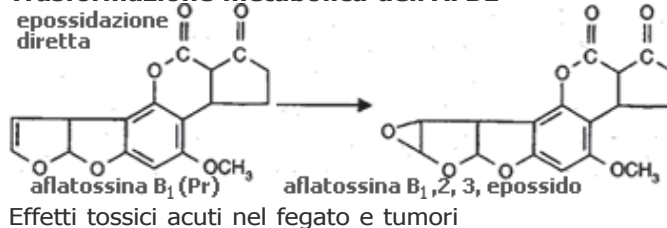
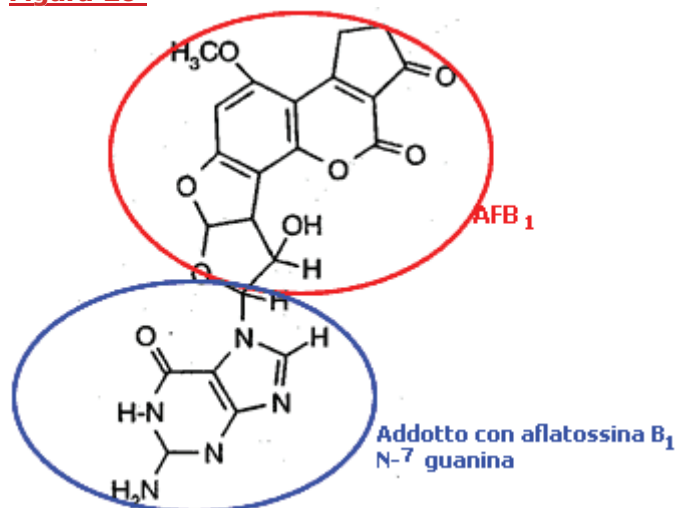
- ergotossina, vasocostrittore,
- ergonovina, stimolante uterino
- acido lisergico, allucinogeno

Figura 18
Principali micotossine

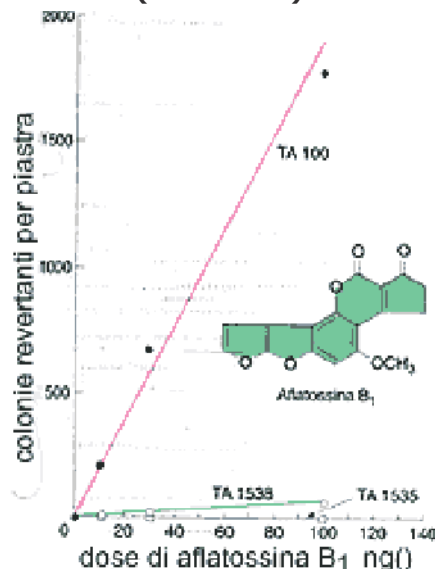
Tipo	Organismo	Tossicità
Tricoteceni presenti su semi di cereali ammuffiti (Orenburg-Siberia 1944)	Fusarium I (cereali ammuffiti rimasti sul terreno)	Agranulocitosi, vomito, diarrea, emorragie multiple (mortalità: 10%)
Ocratossine, presenti in cereali, legumi, birra, caffè, ma anche in carni suine	Aspergillus ochratus presente anche in Italia	Danno renale (Nefropatia endemica nei Balcani simile alla intossicazione di suini nutriti con alimenti contaminati da ocratossina)

Le aflatossine sono comuni contaminanti dell'alimentazione di larga parte della popolazione mondiale che vive nella fascia tropicale, dove le caratteristiche del clima e l'assenza di refrigerazione facilitano la crescita di muffe. Le aflatossine sono un gruppo molto studiato di sostanze. La più importante è l'aflatossina B1 (**figura 19**). Questa tossina ha una DL50 di 0.3-9 mg/kg nei i mammiferi ed è quindi classificata come una sostanza "estremamente tossica". La somministrazione cronica nella dieta di 0.05-0.1 ppm di aflatossina B1 può portare a cirrosi epatica o cancro-cirrosi negli animali da esperimento. Le aflatossine vengono attivate dalle monossigenasi, detossicate dalle GSH-transferasi; formano addotti al DNA nel fegato (**figura 20**) e sono potente mutageni (**figura 21**); provocano tumori epatici nei ratti (a dosi di 15 ppb nella dieta), ma non nei topi.

In molti ceppi di topo esiste infatti una forma di GSH-transferasi che è cinquanta volte più veloce di quella del ratto. La presenza nella dieta di aflatossine ad alte concentrazioni, caratteristica dei paesi dell'Africa equatoriale, è correlata ad un'elevata incidenza di epatoma. L'aflatossina B1 viene attivata a livello epatico dalle monossigenasi e provoca in questo organo un alto livello di danno al DNA. Un cofattore di rischio è la presenza di epatite cronica (anch'essa endemica nell'Africa centrale), che aumenta la proliferazione cellulare e promuove la cancerogenesi (**figura 27-29**). I livelli di aflatossine negli alimenti europei sono basse (**figura 22**).

Figura 19**Trasformazione metabolica dell'AFB1****Figura 20**

Causa trasversioni GC » AT

Figura 21**Attività mutagena dell'Aflatossina B1 classificata come salmonella typhimurium con attivazione metabolica (linea rossa)**

Il ceppo TA100 è sensibile a mutageni che causano sostituzioni di base

Figura 22

Stima dell'assunzione media di AFB1 con la dieta e residui misurati in alcuni alimenti europei

Stato	Assunzione stimata (ng/kg) assunzione calcolata µg/die	Conc arachidi (µg/kg)	Conc cereali (µg/kg)
Belgio	0.20	0.50	0.50
Francia	0.05	8.40	0.45
Germania	0.03-0.3	0.50	0.50
Italia	—	—	7.60
Olanda	0.37	1	0.50
UK	0.09-0.03	2.90	0.33

Valori limite: 5-20 µg/kg. Arachidi e cereali sono gli alimenti più spesso contaminati

Figura 23

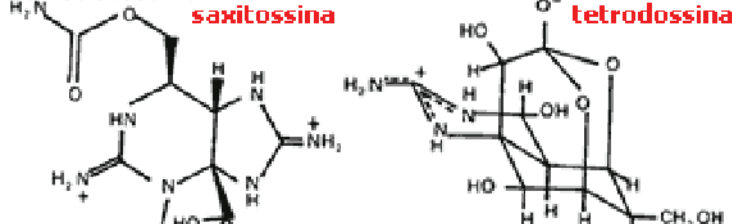
Tossine di origine animale (marina)

Sostanza	Sorgente	Effetto
Saxitossina, Goniautossina (Nord-America)	Molluschi contaminati con plancton (dinoflagellati)	Paralisi, morte, blocco dei canali del sodio
Acido Okadico*, Pectenotossine (anche in Italia)	Molluschi contaminati con plancton (dinoflagellati)	Diarrea, vomito, crampi addominali
Tetrodotossina (Giappone)	Pesce palla o fugu	Paralisi, morte, blocco dei canali del sodio

* È un promotore della cancerogenesi

Figura 24

Struttura chimica della saxitossina e della tetrodotossina

**Figura 25**

Pesce palla o fugu. Ne esistono 90 specie

**Figura 26**

Nella maggior parte i pazienti muoiono dopo 20-30 min dall'ingestione. Circa 125 casi di decessi all'anno in Giappone

Sono infine importanti nei paesi con alto consumo di pesce le intossicazioni da tossine presenti nell'ambiente marino (figura 23). Tra queste ricordiamo le intossicazioni da saxitossina, prodotta da mitili che si alimentano con dinoflagellati. La DL50 per l'uomo della saxitossina è intorno a 1-2 mg, si sono verificati casi di intossicazione mortale anche in Italia.

Per quanto riguarda la tetrodotossina (figura 24), l'avvelenamento è segnalato solo in estremo oriente. Gli orientali sono ghiotti del pesce fugu (figura 25) il cui fegato e ovaio contiene elevatissime concentrazioni di tossina (che viene assunta dalle stelle di mare) e che deve essere rimossa (eliminando, senza danneggiarli, fegato, pelle, intestino e ovaie). Una dose di 1-2 mg di tetrodotossina può essere fatale ad un uomo adulto in 60 minuti, con sintomi neurologici gravi (fascicolazione, paresi e paralisi) (figura 26).

Rammentiamo inoltre che un'importante causa di morbilità, specialmente nei paesi con condizioni igieniche carenti, sono le contaminazioni batteriche degli alimenti. Prima della invenzione degli antibiotici

e del miglioramento delle condizioni igieniche, erano le infezioni alimentari a provocare l'elevata mortalità e la modesta speranza di vita dei nostri antenati. La situazione è ancora simile nella maggior parte dei paesi sottosviluppati (**figura 27**). La **figura 28** riassume le più frequenti tossinfezioni alimentari e gli alimenti che ne sono la causa più frequente. Importante notare che le tossine da stafilococco sono termostabili e quindi resistono anche in cibi cotti contaminati dalle mani di cuochi portatori sani. La latenza dei sintomi può essere di alcune ore o di una giornata (**figura 29**).

Figura 27**Contaminazione batteriche degli alimenti**

Specie batterica	Frequenza % di tossinfezioni
Stafilococco aureo	39
Salmonella	27
Clostridium perfringens	13
Campylobacter jejuni	6
Shigella	4
Yersinia enterocolitica	4
Streptococco gruppo A	3

Figura 28**Contaminazione batteriche**

	Diarrea	Vomito	Cibi implicati
Clostridium perfringens	molto comune	raro	carne cotta e pollame
Bacillus cereus	molto comune	comune	prodotti a base di carne, verdure, minestre, budini, salse, riso
Stafilococcus aureus	comune	molto comune	carne cotta, pollame e prodotti caseari (tossine termostabili)

Figura 29**Contaminazione batteriche**

	Incubazione (h)	Durata della malattia (h)
Clostridium perfringens	8-22	12-24
Bacillus cereus	1-16	6-24
Stafilococcus aureus	2-6	6-24

Figura 30**Catena alimentare: rapporto che lega tra loro i vari componenti di un ecosistema**

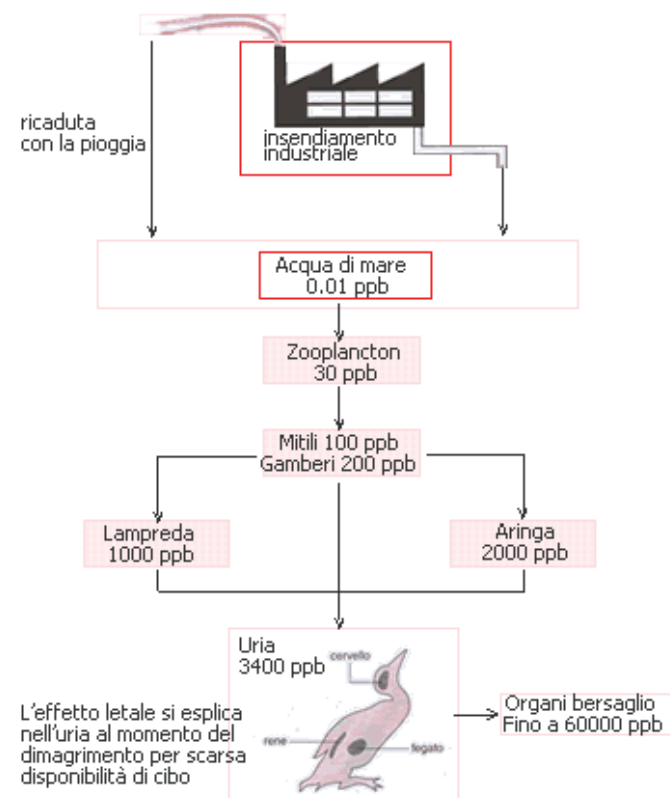
Come schematizza la **figura 30** la dieta può contenere numerose sostanze tossiche a causa dei fenomeni di bioaccumolazione della catena alimentare terrestre e marina (**figura 31**). Questo riguarda in particolare i composti organici persistenti (o POC) ed i metalli pesanti; il fenomeno può aumentare la concentrazione di inquinanti di molti ordini di grandezza (fino a sei log, **figura 32**).

Figura 31

Bioaccumulazione di un tossico nella catena alimentare

**Figura 32**

Bioaccumulazione dei PCB nel mare dopo dispersione nell'ambiente da parte di un insediamento industriale



rox

lezione n. 15

Nitrosamine, ammine eterocicliche e ammine aromatiche

Gli N-nitrosocomposti sono composti chimici caratterizzati dalla presenza di un residuo $\text{NN} = \text{O}$, presenti in molti alimenti (**figura 1**). Si distinguono in nitrosammine e nitrosamidi (**figura 2**) e derivano dalle reazioni con nitrito di molte sostanze azotate (**figura 2**). Queste reazioni, dette di "nitrosazione" (**figura 3**), avvengono in ambiente acquoso a pH leggermente acido in presenza di acido nitroso, in assenza di scavenger come i polifenoli e la vitamina C. Queste condizioni si realizzano facilmente nello stomaco, soprattutto in soggetti che non consumano frutta e verdura. Le nitrosammine sono convertite nell'organismo in forme reattive in grado di interagire col DNA alchilandolo; il primo passo per la loro attivazione è la formazione d'idrossilammine ad opera delle monossigenasi (**figura 4**), spesso instabili, che formano sali di diazonio, che a sua volta danno luogo a composti elettrofili affini per il DNA, in particolare per l'ossigeno in posizione 6 della guanina (**figura 5**).

Figura 1

N-nitrosoderivati:

- caratterizzati dalla struttura $-\text{N}-\text{N}=\text{O}$
- dalla metà degli anni '70, quando fu scoperta la loro presenza negli alimenti, sono oggetto di molte indagini chimiche ed epidemiologiche

Figura 2

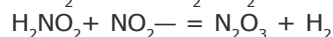
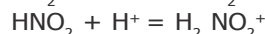
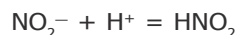
N-nitroso composti:

- Nitrosammine R_1NNOR_2
- Nitrosamidi $\text{R}_1\text{NNOCOR}_2$

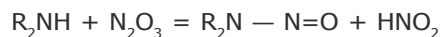
composti azotati come ammine, ammidi, guanidine e urea possono reagire con acido nitroso e formare N-nitrosocomposti

Figura 3

Formazione delle n-nitrosammine, pH ottimale: ~3



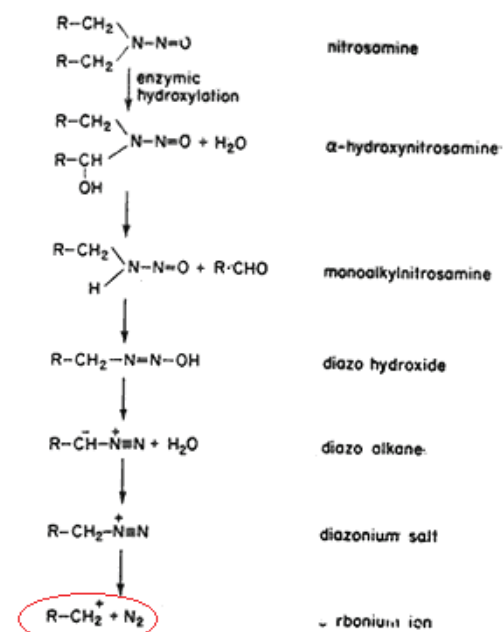
.....



Inibitori della nitrosazione: acido ascorbico, fenoli

Figura 4

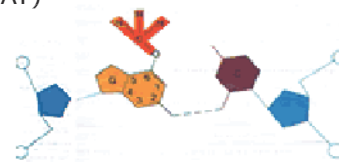
Metabolismo delle N-dialchilnitrosammine



Enzima ossidante: Cyp4502E1

Figura 5

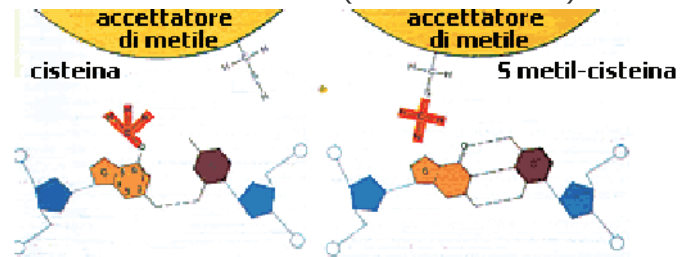
Alchilazione dell'O in posizione 6 della Guanina da nitrosammine metilanti O⁶metG si appaia con T (trasversione GC » AT)



Le metilazioni, etilazioni o alchilazioni da nitrosammine possono essere rimosse da enzimi della riparazione del DNA (**figura 6**), ma se persistono danno luogo a mutazioni. Le nitrosammine metilanti (metilnitrosammine), danno addotti metilati stabili con la guanina e causano trasversioni se non sono riparate dalle alchiltransferasi. I livelli di questi addotti sono particolarmente alti negli organi con scarsa attività di riparo, come il cervello (**figura 7**). Nitrosamidi e nitrosammine sono sostanze dotate di un forte potere cancerogeno. Hanno dei nomi complessi, che spesso vengono abbreviati (**figura 8**). Le strutture chimiche delle principali nitrosammine sono riportate nella **figura 9**.

Figura 6

Riparazione della metilazione del DNA da nitrosammine tramite un'alchiltransferasi (accettrice di metile)

**Figura 7**

L'organo-specificità di alcuni N-Nitroso composti dipende dalla relativa inefficienza di sistemi di riparazione del DNA nell'organo bersaglio

Organo	Addotto al DNA (t 1/2)	Induzione di tumori
Fegato	O ⁶ EtG (30 h)	±
Cervello	O ⁶ EtG (220 h)	++++ (ratti trattati con ENU)

Mancanza della alchiltransferasi nel cervello

Rajewsky, Z Naturforsch 38, 1203-1209, 1983

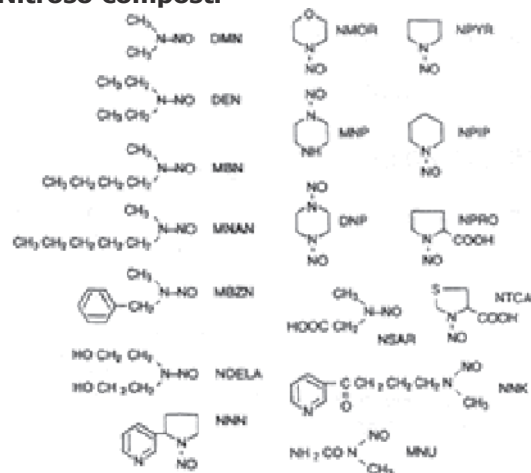
Figura 8

Principali N-nitrosammine

Abbreviazione	N-NITROSAMMINA
DMN	N-nitrosodimetilammina
DEN	N-nitrosodietilammina
NPYR	N-nitrosopirrolidina
NPIP	N-nitrosopiperidina
MEN	N nitrosoetilmetilammina
DPN	N-nitrosopropilammina
MBN	N-nitrosobutilmetilammina
DBN	N-nitrosodibutilammina
NNN	N-nitrosornicotina

Figura 9

Struttura chimica e abbreviazione di alcuni N-Nitroso composti



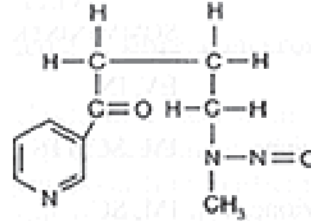
Il fumo di tabacco contiene nitrosammine specifiche, come la N-nitronornicotina (NNN) e la 4-[metilnitrosoamino-1(3-piridil)]-1-butanone (NNK) (figura 10), che si formano con la nitrosazione della nicotina nella combustione del tabacco. La NNK e la NNN sono potenti cancerogeni negli animali da esperimento, nei quali inducono tumori (polmone, cavità nasali, trachea, fegato e pancreas (figura 11)).

Le nitrosammine sono potenti mutageni, teratogeni e cancerogeni; l'esposizione umana è dovuta alla presenza di nitroso composti preformati negli alimenti o formati nello stomaco in seguito alla nitrosazione di amine secondarie; questa reazione è favorita da un ambiente acido e dalla presenza di nitriti, condizioni presenti nello stomaco dove i nitrati presenti negli alimenti o nelle acque possono essere ridotti a nitriti e reagire con amine secondarie (anche queste presenti nei cibi). La presenza di nitrosammine negli alimenti, dovuta all'uso di nitrati e nitriti come conservanti è stata messa in relazione con l'alta incidenza di tumori gastrici in alcune parti del mondo, tra cui la Toscana. Particolarmente elevata è la frequenza di tumori dell'esofago e del nasofaringe in alcune popolazioni cinesi, esposte a nitrosammine (figura 12).

Come abbiamo visto le nitrosammine possono essere assunte dall'ambiente o sintetizzate nello stomaco (figura 13). N-nitroso composti possono anche essere formati nella cottura dei cibi alla fiamma, per effetto della reazione di ammine con ossidi di azoto a caldo, o migrare da componenti della plastica negli alimenti (tettarelle di gomma, plastiche di cattiva qualità).

Figura 10

Struttura chimica della NNK, nitrosammina prodotta dalla combustione della nicotina: 4-metilnitrosoamino-1-(3-piridil)-1-butanone (NNK)



La NNK è uno dei responsabili dell'induzione di tumori da fumo di sigaretta

Figura 11

Sedi di induzione di tumore da N-Nitroso composti nel ratto

- **nitrosammine:** fegato, esofago, mucosa nasale e boccale, rene, pancreas, vescica, polmone, tiroide
- **nitrosammidi:** sistema linfatico e nervoso e (per os) stomaco e duodeno

Figura 12

Nitrosammine implicate nell'eziologia dei tumori dello stomaco, dell'esofago e del nasofaringe.

Alta frequenza di neoplasie in alcune zone della Cina dove si usa cibo salato (pesce Cantonese, ricco di nitrosammine, anche 1 mg/kg).

- Linxian: 160/100.000 cancro esofageo (nitrosammine 634-107 µg/d)
- Yuxian 27/100000 cancro esofageo (nitrosammine 205-0.2 µg/d)

Figura 13

Origine dei N-Nitroso composti:

Ambientale

- Dieta (carni trattate con $\text{NO}_{2/3}$)
- Bevande (a base di malto)
- Cosmetici
- Esposizione occupazionale (lavorazione della gomma)

Endogena

- Nitrosazione di ammine e ammidi in diverse aree dello stomaco (pH 2-4)

I nitrati ed i nitriti (che derivano dai nitrati per riduzione catalizzata dai batteri, dagli enzimi cellulari o spontanea (figura 14), sono usati negli alimenti come antifermentativi ed antibotulinici e perché mantengono rosso-rosa il colore della carne (figura 15).

I nitrati sono una componente importante della nostra dieta (figura 16) e, a parte gli insaccati (dove vengono aggiunti per migliorare la conservazione) sono naturalmente presenti in numerosi alimenti, anche vegetali (figura 17). I nitriti sono soprattutto presenti negli insaccati (figura 18). Il livello di nitrati negli alimenti aggiunti agli alimenti conservati non deve superare per legge il limite di 150 ppm (mg/kg); per i nitriti il limite è di 300 ppm.

Figura 14

Fonti di nitriti

Nell'ambiente:

- da nitrati e ammonio ad opera di batteri presenti nell'acqua, suolo, acque di scarico

In vivo:

- dai nitrati ad opera di microrganismi e nello stomaco per azione della nitroreductasi della saliva

Figura 15

Alcune fonti di N-nitroso composti nella dieta.

I nitrati e/o nitriti come additivi alimentari, fissano il colore, inibiscono le ossidazioni, e contrastano la crescita di patogeni (botulismo!)

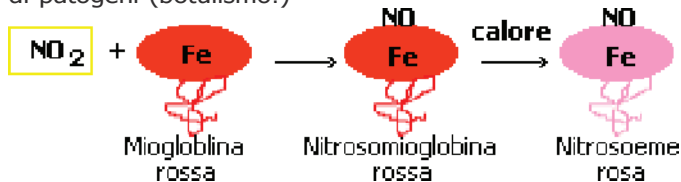


Figura 16

Stima dell'ingestione media giornaliera pro capite di nitrati

	NITRATI mg/persona/d
Inghilterra	117.8
Germania ovest	74.4
Olanda	130.2
Stati Uniti	68.2
Giappone	279
Iran	3.1-6.2

Figura 17

Contenuto di nitrati dei cibi (ppm, mg/kg)

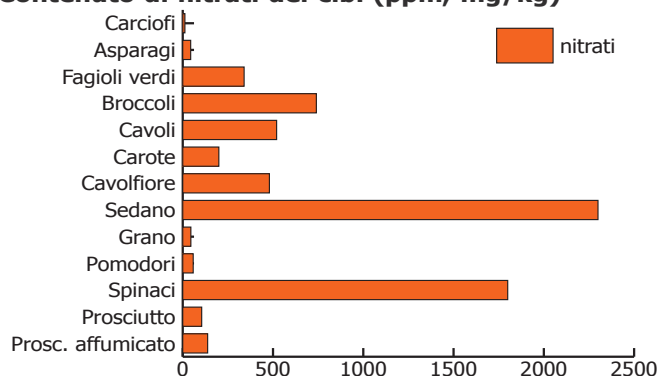
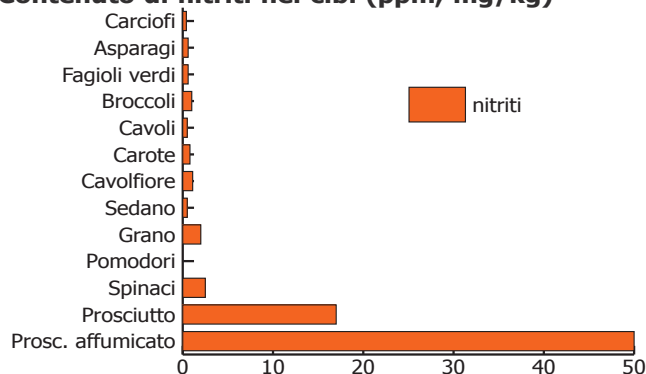


Figura 18

Contenuto di nitriti nei cibi (ppm, mg/kg)



La **figura 19** riassume i livelli di nitrosammine nei più comuni alimenti conservati. La **figura 20** riporta i livelli di nitrosammine nel baccalà, nel formaggio e nel condensato di fumo di sigaretta. Le reazioni di nitrosazione in vivo possono essere inibite dalla vitamina C, da antiossidanti come il butilidrossitoluene (BHA) e il butilidrossianisolo (BHT) e dai fenoli.

Un altro possibile rischio cancerogeno da nitrosammine deriva dal fatto che molti farmaci sono nitrosabili in vivo (**figura 21, 22**). La struttura di questi farmaci, che hanno gruppi amminici liberi, ne permette la nitrosazione con formazione di nitrosoderivati. La combinazione di alcuni di questi farmaci con i nitriti provoca tumori negli animali da esperimento (**figura 23**).

Le nitrosammine, essendo potenti cancerogeni, sono riconosciuti come potenziali agenti causali di molti tumori umani. La loro concentrazione è controllata nei processi di formazione degli alimenti industriali. Risulta più difficile per gli alimenti preparati in casa; un'altro fattore che può notevolmente ridurre il rischio di cancro da nitrosammine è un alto consumo di frutta e verdura. Infatti l'acido ascorbico è un potente inibitore dei fenomeni di nitrosazione. È infatti dimostrato che tumori come il cancro gastrico, che si presume essere legato alla assunzione di nitrosammine, sono inversamente correlati con la quantità di frutta ingerita e con l'ingestione di vitamina C.

Figura 19

Sorgente alimentare	Tipo di nitrosammine	Concentrazione (ppb, µg/kg)
Salame	DMN	10-80
Pancetta	DMN, DEN, NPYR, NPIP	1-40
Pesce salato Pesce Cantonese	DMN	59-100 602-1508
Salmone trattato con nitriti e nitrati	DMN	0-26

Figura 20

Sorgente alimentare	Tipo di nitrosammine	Concentrazione (ppb, µg/kg)
Merluzzo fresco e salato	DMN	1-4
Frutta	DMN	ND
Formaggio	DMN	1-4
Condensato di fumo di tabacco	DMN, DEN, MEN, MBN, DPN, NPYR, NPIP, DBN, NNN	0-180 ng/sigaretta

Figura 21**FARMACI NITROSABILI. 1**

- Penicillina V
- Penicillina G
- Cloxacillina
- Propranololo
- Ampicillina
- Iproniazide
- Aminopirina
- Fenilefrina
- Timololo
- Etanbutolo
- Cidizina

Figura 22**FARMACI NITROSABILI. 2**

- Prometazina
- Fenilpropanolamina
- Clomipramina
- Eritromicina
- Nortriptilina
- Clomifene
- Atenololo
- Maprotilina
- Acido 6-aminopenicillanico
- Imipramina
- Clorpromazina

Figura 23**Induzione di tumori nel ratto dopo ingestione di farmaci nitrosabili e NO₂**

Trattamento	Ratti con tumori epatici	Ratti maschi F344 Esperimento di cancerogenesi (Risultati dopo 2 anni)
Controlli	5	
NO ₂ (2000ppm)	3	
Difenidrammina (2000ppm)	4	
Difenidrammina (2000ppm)+ NO ₂ 2000ppm)	11*	
Clorfeniramina (1000ppm)+NO ₂ 2000ppm)	14*	

Lijinsky, Food Chem Toxicol 22, 715-720, 1984

Le ammine eterocicliche (AE) sono un gruppo molto interessante di mutageni e cancerogeni con peso molecolare di circa 200-300, contenenti anelli eterociclici e gruppi aminici liberi. Furono isolate, negli anni '70, durante la pirolisi di aminoacidi da Sugimura ed il suo gruppo nel National Cancer Institute, Tokio, e in condizioni più blande di cottura degli alimenti dall'autore del libro. Il gruppo di Sugimura ha il merito dell'isolamento dei singoli elementi del gruppo, che sono indicati con sigle semplificate (**figura 24**). Si formano tutte le volte che alimenti come carne ed il pesce sono a contatto con una fonte di calore superiore a cento gradi. Per questo il contenuto è più alto nella parte esterna degli alimenti a contatto con gli elementi scaldanti (**figura 25**).

Figura 24
Struttura delle principali ammine eterocicliche

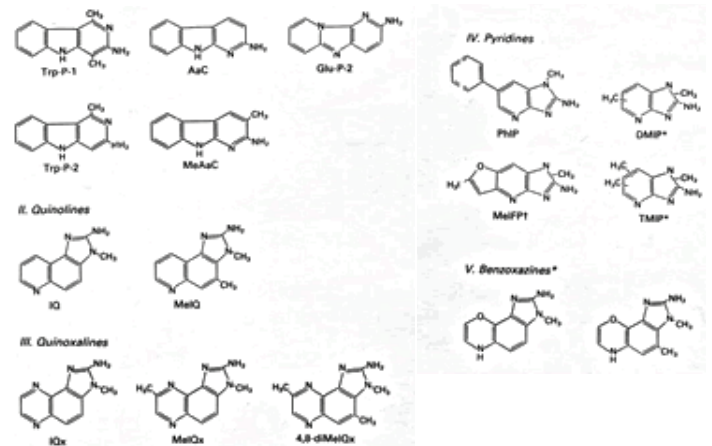
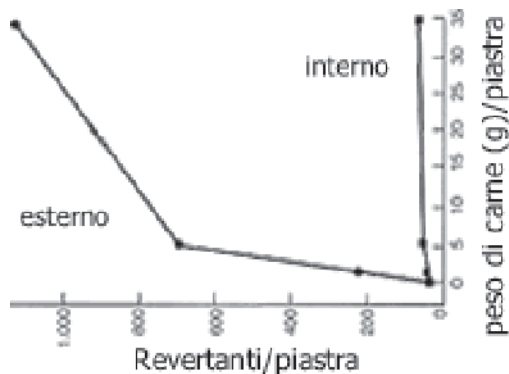


Figura 25
Attività mutagenica in *Salmonella typhimurium* TA 1538 con attivazione metabolica dell'interno e dell'esterno di un hamburger

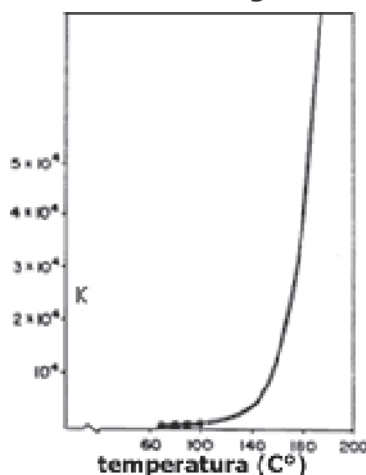


Da Dolara et al., Science 201, 913-916, 1978

Figura 26
Fattori che determinano la formazione di mutageni nei cibi durante la cottura

- proteina
- creatina
- temperatura
- contenuto in acqua
- contenuto in zucchero/grassi
- tempo di cottura

Figura 27
Formazione di mutageni in funzione della temperatura



K = numero di revertanti per piastra (*Salmonella typhimurium* TA 1538 + S9) provocati dall'aggiunta di brodo di carne bollito a diverse temperature

Dolara et al., Mutat Res 60, 231-237, 1979

La potenza mutagenica di queste sostanze è notevole. Il numero di revertanti indotto in *Salmonella typhimurium* con attivazione metabolica da 1 µg di Trp-P-1 è di 39.000, e 661.000 con 1 µg di MeIQ. Ciò significa che 1 ng di MeIQ aumenta la frequenza di mutazione in salmonella da valore di 20×10^8 (background) a circa 600×10^8 nel ceppo TA1538, in presenza di attivazione metabolica esogena con microsomi di fegato di ratto (S9).

Le ammine eterocicliche (AE) hanno strutture variabili, aminogruppi liberi ed eterocicli contenenti carbonio e azoto; vengono assorbite, e sono capaci di indurre mutazioni nelle cellule di mammifero. Vengono metabolizzate a composti inattivi glucuronati o solfati o attivate a composti mutageni dalle monossigenasi (figura 29); successivamente possono essere glucuronate e escrete, o coniugate con solfato. Alcuni dei metaboliti sono capaci di dare addotti al DNA (figura 30).

Negli animali da esperimento producono tumori del fegato e del colon (figura 31), dello stomaco, della mammella, della cute, del sistema linfatico e del polmone (figura 32). I livelli di ammine eterocicliche nel pesce e nella carne alla griglia e arrosto sono riassunti nelle figura 33 e nella carne fritta nella figura 34.

Figura 28
Formazione delle ammine eterocicliche (AE)

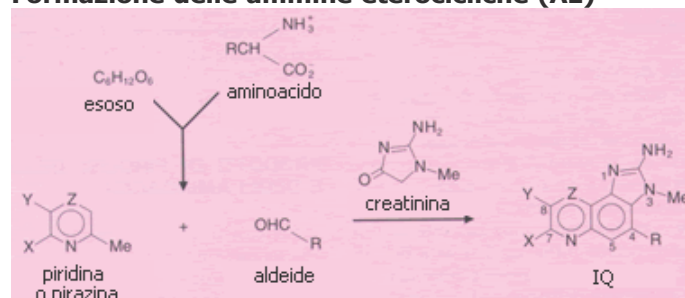


Figura 29
Metabolismo delle ammine eterocicliche (AE)

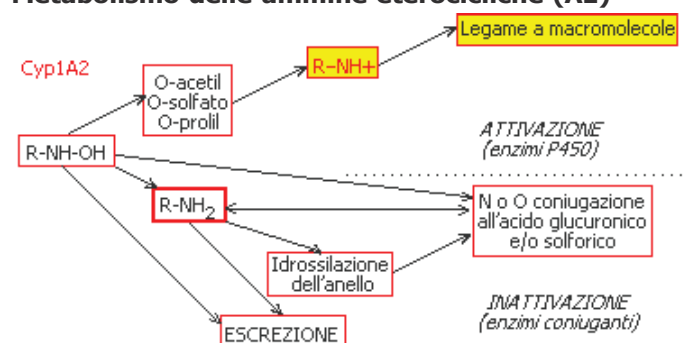


Figura 30
Addotti al DNA di alcune ammine eterocicliche

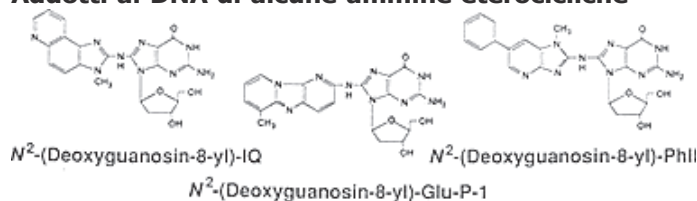


Figura 31
Tumori intestinali indotti da alcune ammine eterocicliche in ratti F344



Nigao e Sugimura, Mutat Res 290, 43-51, 1993

Figura 32
Effetti mutageni (salmonella) e cancerogeni (roditori) di alcune ammine eterocicliche

HCA	Revertanti /µg (Ceppo TA98)	Specie	Tumori
MeIQ	47.000.000	Topo Ratto	Fegato, prestomaco, ghiandola di Zymbal, bocca, colon, pelle, gh. mammaria
IQ	898.000	Topo Ratto	Fegato, prestomaco, polmone, fegato, gh. mammaria, gh. di Zymbal
PhIP	1.800	Topo Ratto	Fegato, prestomaco, linfoma,colon, gh. mammaria

Idem

Figura 33

Ammine eterocicliche in cibi cucinati ad alta temperatura

	ng/g	Sorgente
Trp-P-1	13.3	Pesce arrosto
A α C	651	Carne alla griglia
MeA α C	63	Carne alla griglia
IQ	20	Pesce arrosto
4-MeIQ	17	Pesce arrosto

*Nigao e Sugimura, Mutat Res 290, 43-51, 1993***Figura 34**

Ammine eterocicliche in cibi cucinati ad alta temperatura

	ng/g	Sorgente
8-MeIQX	0.1	Carne fritta
4,8-diMeIQX	0.06	Carne macinata fritta
PhIP	15	Carne macinata fritta

Idem

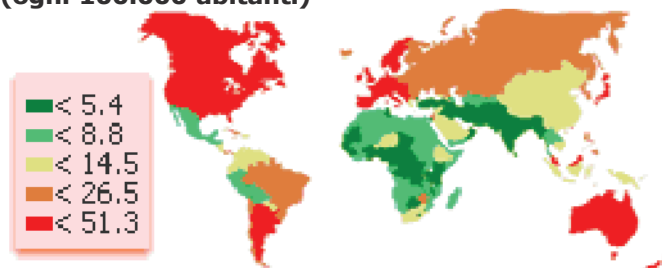
Si pensa che le ammine eterocicliche siano coinvolte nella genesi delle mutazioni che sono alla base di comuni tumori umani, come quelli del colon che hanno alta frequenza nei paesi con alto consumo di carne rossa (**figura 35**); anche il consumo di carne ben cotta è correlato al rischio di cancro del colon (**figura 36**); il consumo di carne con alti livelli di ammine eterocicliche è probabilmente correlato anche al rischio di cancro della mammella.

La formazione di ammine eterocicliche nella carne cotta può essere ridotta diminuendo lo stress termico sulla superficie degli alimenti. Mangiare poca carne o essere vegetariani è un'altra opzione possibile.

Le ammine aromatiche (AA) sono composti usati nelle sintesi chimiche in particolare di coloranti, ma sono anche prodotte dal fumo di tabacco (**figura 37**). Sono composti altamente cancerogeni, in particolare per la vescica (**figura 38**). Le principali sono indicate nella **figura 39**. Le ammine aromatiche hanno un metabolismo complesso,

Figura 35

Incidenza del cancro del colon/retto nel mondo (ogni 100.000 abitanti)

**Figura 36**

Cottura della carne e tumori del colon (studi epidemiologici)

R.R. di tumore nei consumatori di carne ben cotta vs consumatori di carne al sangue	Rischio relativo (RR \pm 95%CL)	Referenze
	2.7 (1.4-5.9)	Giovannucci, J Womens Health 12, 173-182, 2003
	3.5 adeno-carcinomi	
	2.2 (1.1-4.3) adenomi	

Figura 37

Le ammine aromatiche



Sono state usate come precursori dei coloranti
Sono liberate dal fumo di sigaretta

Figura 38

Principali ammine aromatiche

- anilina
- o,m,p-toluidine
- 4-aminobifenile
- naftilammine

Le ammine aromatiche (salvo l'anilina) sono probabilmente implicate nella cancerogenesi del polmone e della vescica

che è riassunto nella **figura 40**, dove i metaboliti reattivi sono rappresentati in rosso e quelli inattivi in verde. Le ammine aromatiche sono ossidate dalle monossigenasi e formano idrossilammine reattive, che possono formare addotti al DNA. Tuttavia sono anche glucuronate e acetilate. I composti glucuronati sono idrofilari e vengono eliminati in vescica. Tuttavia i glucuronidi possono scindersi a pH acido e liberare di nuovo composti reattivi (ione nitrenio), provocando cancro della vescica anche quando sono originariamente assorbite per via alimentare o respiratoria.

Le ammine aromatiche sono importanti come cancerogeni industriali, ma anche come inquinanti ambientali. Infatti sono presenti anche ad alte concentrazioni nell'aria inquinata da fumo passivo (**figura 41**), questa è una delle motivazioni del divieto di fumare nei locali pubblici. Nelle case dei fumatori i livelli di ammine aromatiche sono circa doppi rispetto a quelli misurati nelle case di non fumatori (**figura 42**).

Figura 39

Alcune ammine aromatiche

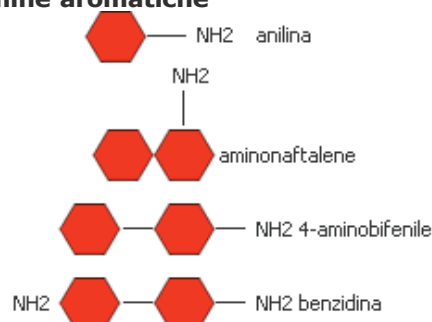


Figura 40

Metabolismo delle ammine aromatiche e cancro vescicale

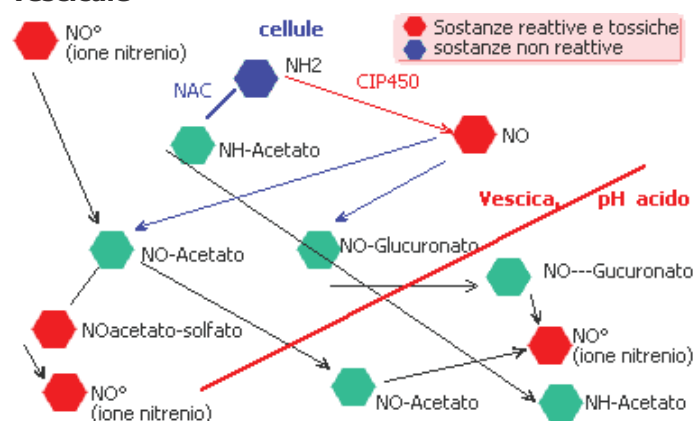
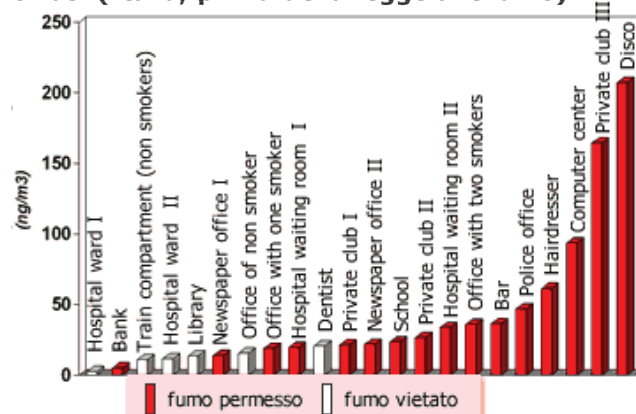


Figura 41

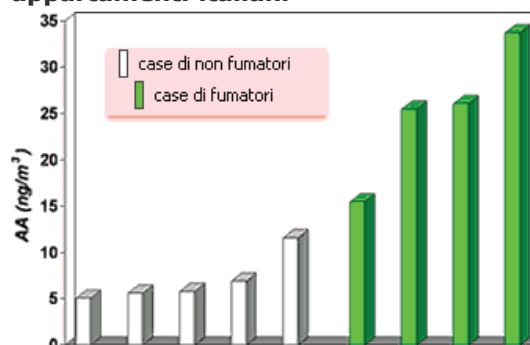
Livelli ambientali di ammine aromatiche in locali chiusi (Italia, prima della legge antifumo)



Rielaborato da dati di Dolara et al.,
Chemosphere 43, 355-361, 2001

Figura 42

Livelli di ammine aromatiche (AA) negli appartamenti italiani



Idem

rox

lezione n. 16

Tossicologia del fumo di tabacco

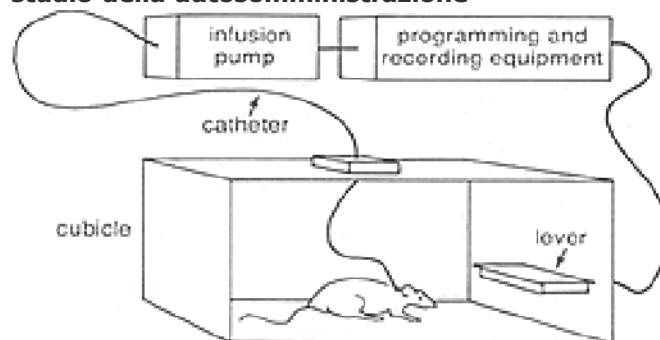
Il tabacco è arrivato in Europa verso la fine del '500 dal Portogallo, un po' dopo la scoperta dell'America. All'inizio il tabacco in Europa veniva solo fiutato (la nicotina si assorbe bene anche per via nasale). È solo con la fine del XIX secolo che l'abitudine al fumo diventa un fenomeno di massa, prima con la diffusione del sigaro e, agli inizi del '900, con le sigarette industriali, simili (a parte il filtro) a quelle attuali.

A causa della presenza di uno psicostimolante, la nicotina, il fumo di sigaretta induce una vera tossicodipendenza, come si può dimostrare con protocolli di autosomministrazione nel ratto (**figura 1**). Tradotto in dose/die, un fumatore medio assume circa 10-20 mg di nicotina, equivalente a circa 150-300 ng/kg, una dose simile a quella che produce tossicodipendenza nel ratto (**figura 2**).

Le industrie del tabacco sono state accusate di aver aumentato il livello di nicotina nelle sigarette per indurre maggior tossicodipendenza, ma l'affermazione non corrisponde a verità, perché negli ultimi anni il contenuto di catrame e di nicotina per sigaretta è diminuito considerevolmente (**figura 3**).

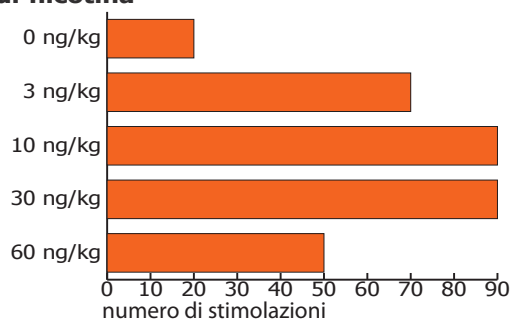
La tossicodipendenza da nicotina, come altre dipendenze, è in parte sotto controllo genetico. È infatti dimostrato che i soggetti con polimorfismi del recettore dopaminergico Drd2 A1 hanno maggior difficoltà ad interrompere l'abitudine al fumo (**figura 4**).

Figura 1
Tossicodipendenza da nicotina: apparato per lo studio della autosomministrazione



O'Dell et al., Ann N Y Acad Sci. 1021, 167-174, 2004

Figura 2
Frequenza nel ratto della autosomministrazione di nicotina



Idem

Figura 3
Variazioni storiche del contenuto medio/sigaretta di catrame (linea tratteggiata) e nicotina (linea continua)

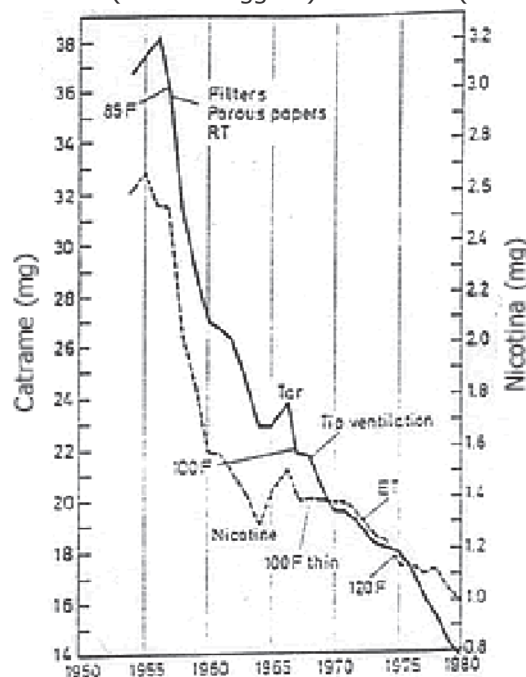


Figura 4
I soggetti con il gene per il recettore dopaminergico Drd2 A1 hanno più difficoltà a smettere di fumare dei soggetti con il gene Drd2 A2

Cinciripini, Nicotine Tob Res. 6, 229-239, 2004

Il maggiore produttore di tabacco è la Cina (**figura 5**) seguito dagli USA e dall'India. L'Italia è in nona posizione (**figura 6**). I maggiori consumatori pro capite in Europa sono gli Spagnoli (**figura 7**). Il consumo di sigarette ha raggiunto dimensione epidemiche in tutto il mondo, anche se è in riduzione nell'occidente (**figura 8**), dove mediamente si fumano sigarette con meno condensato e c'è una certa tendenza alla riduzione dell'abitudine al fumo. Nei maschi l'abitudine al fumo è omogenea nelle diverse classi di età (**figura 9**), nelle femmine è invece caratteristica delle classi giovanili (**figura 10**), anche se mediamente le femmine fumano assai meno dei maschi.

Figura 5
Sigarette cinesi



Figura 6

I primi 10 produttori di tabacco nel mondo (in migliaia di t)

1. Cina 3.019
2. Stati Uniti 714
3. India 528
4. Brasile 442
5. Turchia 213
6. Zinbabwe 8
7. Indonesia 162
8. Grecia 141
9. Italia 130
10. Pakistan 104

Dal Rapporto Nazionale sul fumo 2005 <http://www.iss.it/binary/ofad/cont/PACIFICI.1153395176.pdf>, modificato

Figura 7

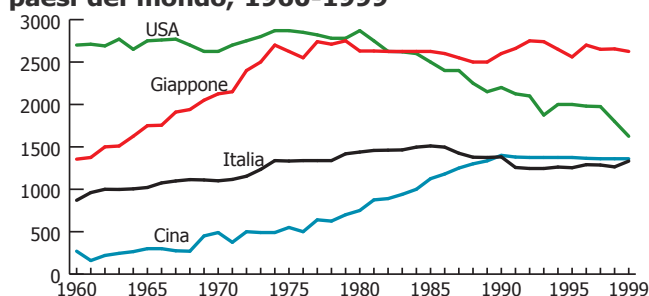
Vendita di sigarette e consumo annuo pro capite in alcuni paesi dell'Unione Europea, 1996

Paese	Vendita di sigarette in miliardi	Consumo annuo sigarette/pro capite
Spagna	81	2065
Germania	136	1666
Austria	13	1646
Italia	90	1550
Belgio e Lussemburgo	16	1540
Portogallo	16	1477
Francia	85	1467
Gran Bretagna	83	1418
Paesi Bassi	17	1115

Idem

Figura 8

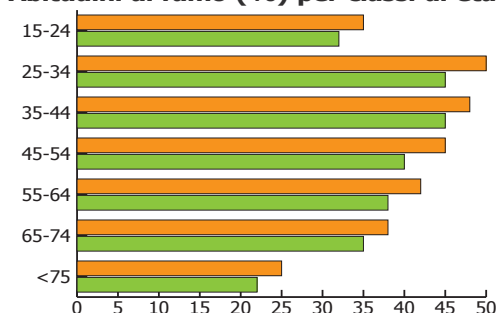
Consumo di sigarette pro capite in Italia ed alcuni paesi del mondo, 1960-1999



Idem

Figura 9

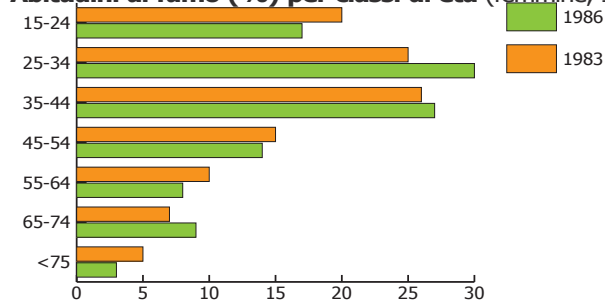
Abitudini al fumo (%) per classi di età (maschi, Italia)



Idem

Figura 10

Abitudini al fumo (%) per classi di età (femmine, Italia)



Da Rapporto Nazionale sul fumo 2005 <http://www.iss.it/binary/ofad/cont/PACIFICI.1153395176.pdf>, modificato

Negli ultimi anni il consumo medio di sigarette non è diminuito in Italia per le femmine come per i maschi (figura 11). Infatti la diminuzione è apparente in tutte le classi di età per i maschi (figura 12) ma non per le femmine giovani (figura 13). Le sigarette fumate adesso in Italia sono a contenuto di condensato (catrame) più basso (figura 14). Gli effetti sulla salute di questa variazione non sono chiari, perché le sigarette contengono molti composti tossici accanto al catrame, presenti anche nelle sigarette "light".

Figura 11

Fumatori (%) nel periodo tra il 1980-1998 in Italia

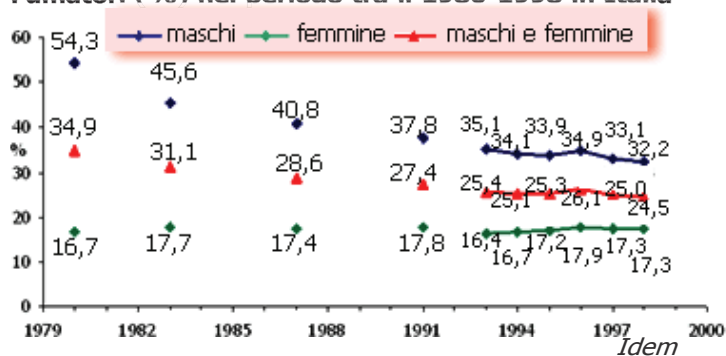
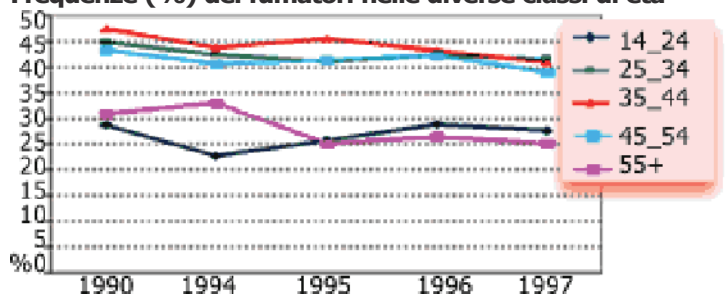


Figura 12

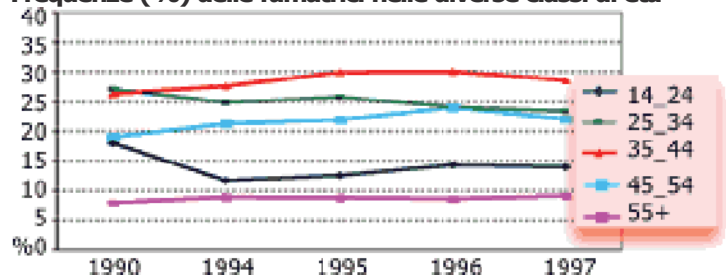
Frequenze (%) dei fumatori nelle diverse classi di età



Idem

Figura 13

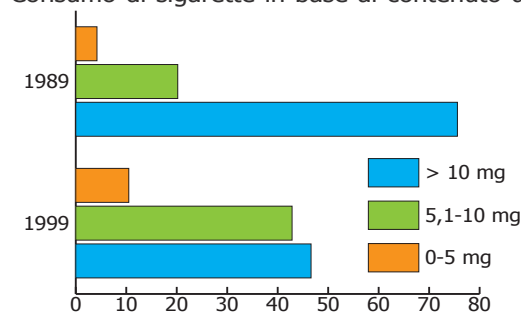
Frequenze (%) delle fumatrici nelle diverse classi di età



Idem

Figura 14

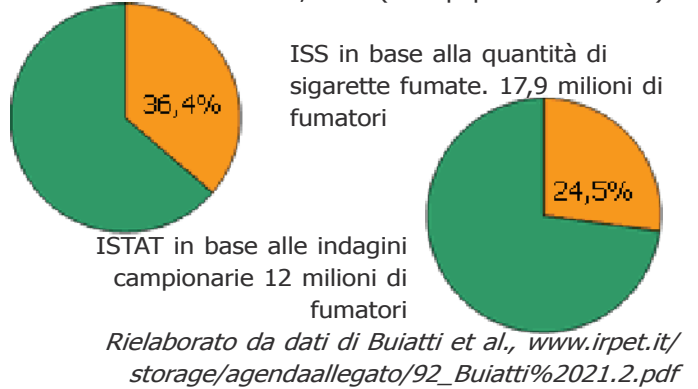
Consumo di sigarette in base al contenuto di condensato



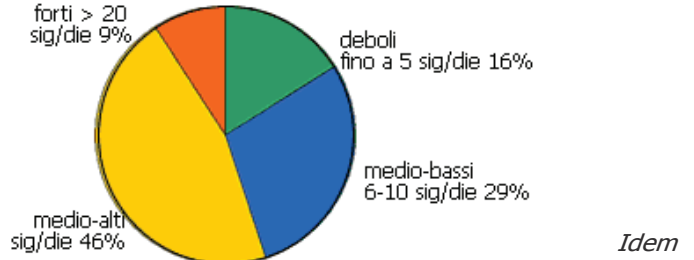
I fumatori in Italia sono, a secondo del metodo di indagine, circa 12-18 milioni (**figura 15**); i fumatori medio alti costituiscono il 46% del totale (**figura 16**). È interessante notare che, in Italia, mentre i maschi più scolarizzati fumano meno (**figura 17**) il contrario avviene per le donne. La Toscana ha un numero di fumatori più elevato rispetto all'Italia (**figura 18**), il che si riflette in un'elevata incidenza di tumori polmonari, che sono in aumento per le donne (anche se partono da un livello più basso rispetto ai maschi); l'incidenza è invece in diminuzione per i maschi (**figura 19**).

Figura 15

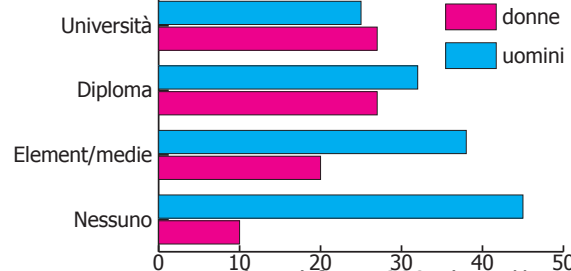
Stima dei fumatori in Italia, 1998 (nella popolazione >14 a.)

**Figura 16**

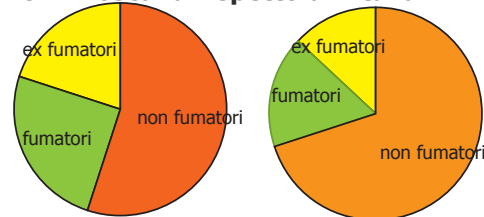
Il fumatore italiano, 1997

**Figura 17**

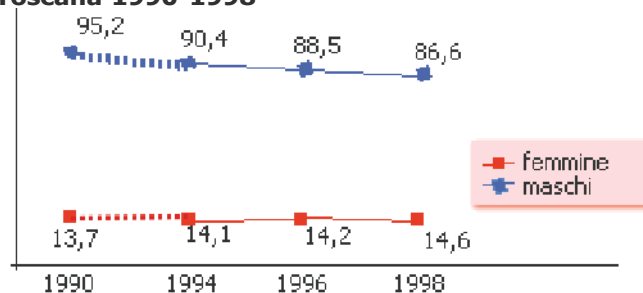
Prevalenza (%) di fumatori in relazione a classi di educazione

**Figura 18**

Il fumo in Toscana rispetto all'Italia

**Figura 19**

Andamento incidenza tumori del polmone. Toscana 1990-1998



Le sostanze tossiche principali presenti nel fumo di sigaretta sono circa 4000. La nicotina è la principale sostanza attiva e responsabile degli effetti psicosomatici e neurovegetativi del fumo. Accanto alla nicotina i composti tossici più importanti sono l'ossido di carbonio e l'aldeide formica (**figura 20**), il metanolo, l'acetone nitrile e la piridina (**figura 21**), lo stirene, il piombo e l'arsenico (**figura 22**), gli IPA, le nitrosammine e le ammine eterocicliche (**figura 23**) e infine il benzene (**figura 24**). Il benzene è responsabile dell'aumento di rischio di leucemia nei fumatori (**figura 25**).

La maggiore patologia provocata dal fumo di tabacco è comunque il cancro del polmone. In Italia, i tumori polmonari sono frequenti (**figura 26**), nei maschi e, in misura inferiore, nelle femmine, che fino ad oggi fumavano meno (**figura 27**); sono più comuni nelle regioni del centro nord sia per i maschi sia per le femmine (**figura 28**). Nelle isole sono meno frequenti che nel continente. I cancri del polmone sono ancora malattie incurabili ed hanno una pessima sopravvivenza; sono dovuti all'azione sinergica di potenti cancerogeni (PAH, nitrosammine, ammine eterocicliche) e di promotori (agenti ossidanti e catrame) che aumentano la proliferazione cellulare

Figura 20**Costituenti tossici del fumo diretto ($\mu\text{g}/\text{sigaretta}$)**

Nicotina (stimolante, induttore di dipendenza)	1000-3000
CO (tossico degli enzimi con eme)	7000-12000
Formaldeide (cancerogeno)	20-100

Figura 21

Metanolo (tossico cellulare)	50-100
Acetonitrile (solvente tossico)	50-100
Piridina (solvente tossico)	20-200

Figura 22

Stirene (ossidato a stirene ossido, mutageno)	10
Pb Metallo pesante, tossico cellulare	8-10
As Metallo pesante, tossico cellulare	0.5-0.9

Figura 23**Costituenti del fumo con effetto cancerogeno dimostrato a livello polmonare**

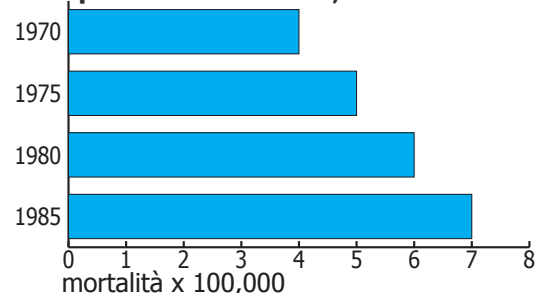
PAH o IPA cancerogeni	20-70 ng/sigaretta
Nitrosammine, Ammine eterocicliche (PhiP, Trp1, Trp2)	0.1-180 ng/sigaretta 10 ng/sigaretta

Figura 24**Costituenti del fumo con effetto leucemogeno**

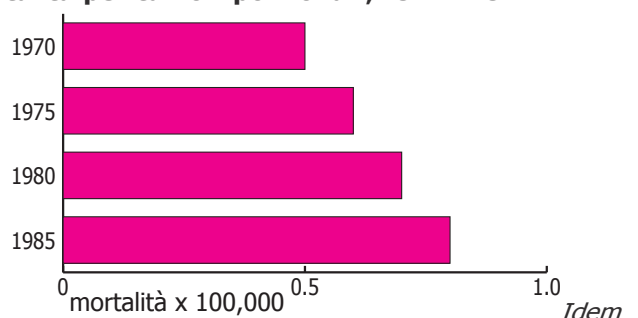
Benzene	12-48 $\mu\text{g}/\text{sigaretta}$
---------	--------------------------------------

Figura 25**RR di leucemia nei fumatori: 1.5-2 Il 4-48% di quest'aumento è dovuto al benzene**

Korte et al., Environ Health Persp, 108, 333-339, 2000

Figura 26**Mortalità per tumori in Italia, maschi**

Rielaborato da dati dell'Associazione Italiana Registri Tumori URL <http://www.registri-tumori.it>

Figura 27**Mortalità per tumori polmonari, femmine**

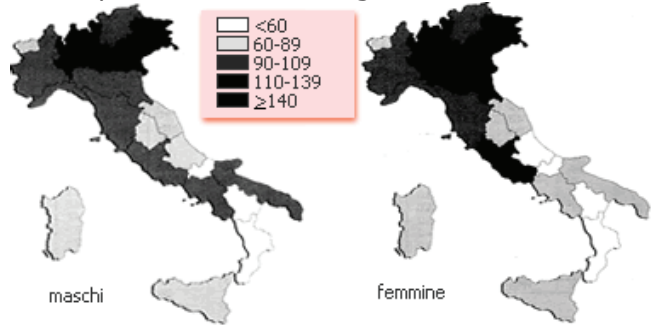
in particolare a livello della mucosa respiratoria. Una concausa sono anche le infezioni croniche respiratorie, molto comuni nei fumatori.

Il rischio relativo di tumori polmonari è più forte con le sigarette rispetto ad altre forme di fumo, e può arrivare nei maschi a valori vicini a 10 (**figura 29**), in funzione del tipo e della quantità di sigarette fumate. Il rischio relativo delle femmine fumatrici è stato studiato da epidemiologi americani (**figura 30**) e può essere fino a 20 volte più alto rispetto alle non fumatrici (**figura 31**), forse perché le donne hanno un fattore di rischio ulteriore, presente nel cromosoma X, il GRPR (Gastrin Releasing Peptide Receptor), che stimola, a parità di esposizione, la proliferazione dell'epitelio bronchiale nelle fumatrici (**figura 32**).

Un discorso a parte meritano le ammine aromatiche AA, tra le quali l'anilina, le o-m- e p-toluidine e il 4-aminobifenile (vedi il capitolo specifico per una discussione della loro tossicologia). Queste ammine aromatiche si liberano nella combustione del tabacco, e sono presenti in particolare nel cosiddetto fumo laterale. Le ammine aromatiche sono responsabili di tumori vescicali, perché vengono metabolizzate a derivati inattivi, che poi si scindono e danno luogo a composti tossici reattivi a livello vescicale. Possono arrivare a 200 ng per sigaretta fumata (**figura 33**) e sono contenute ad alti livelli nell'aria di ambienti interni contaminati da fumo di sigaretta, dove possono raggiungere concentrazioni fino a 200 ng/m³ (**figura 34**). Queste elevate concentrazioni, insieme ai livelli elevati di PAH, spiegano e giustificano

Figura 28

Tumori polmonari in Italia. Registro tumori di Aviano



SMR: standardized mortality ratio. SMR medio = 100

Rielaborato da dati dell'Associazione Italiana Registri Tumori URL <http://www.registri-tumori.it>

Figura 29

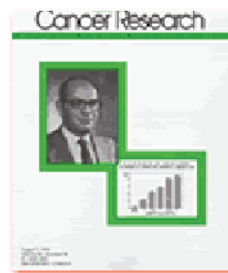
Rischio relativo di tumori polmonari, per maschi 35-84 anni

- Non fumatori: 1
- Pipa 2.23
- Pipa e sigaro 1.23
- Sigaro 2.15
- Sigarette 8.23

Garfinkel e Silverberg, *CA Cancer J Clin.* 41, 137-145, 1991

Figura 30

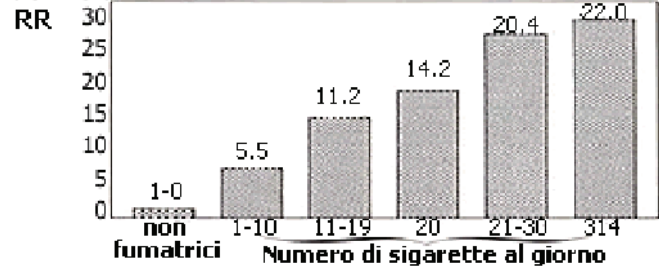
Un argomento popolare. Rischio di neoplasie da fumo di donne americane



Laurence Garfinkel,
Epidemiologo,
American Cancer Society

Figura 31

Rischio relativo di tumore al polmone (RR) in donne americane



Garfinkel et al., *Cancer Research* 59, 35-54, 1959

Figura 32

Correlazione tra GRPR e sesso femminile

- Il GRPR è presente nel cromosoma X
- Il GRPR è attivato dal fumo
- Le donne hanno una risposta iperproliferativa al fumo maggiore dei maschi

Fathi et al., *J Cell Biochem Suppl* 24, 237-246, 1996

Figura 33

Costituenti del fumo con effetto cancerogeno vescicale

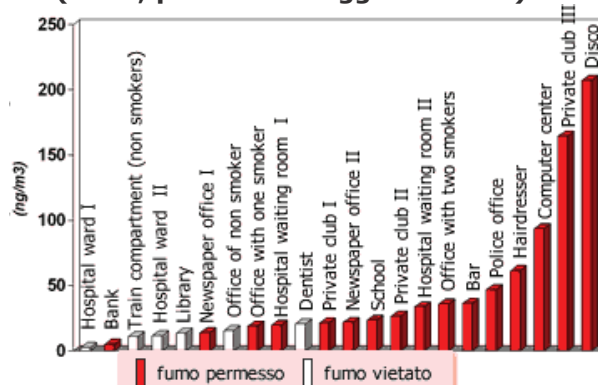
Ammine aromatiche	30-200 ng/sigaretta
-------------------	---------------------

le proibizioni recenti di fumare in luoghi pubblici. Anche negli appartamenti dei fumatori i livelli di ammine aromatiche sono assai superiori rispetto agli appartamenti dei non fumatori (figura 35).

Nonostante i divieti, sono (erano?) spesso i sanitari a contravvenire alle regole ed a dare il cattivo esempio (figura 36). Si fuma(va) dovunque, anche dove non si dovrebbe, anche per colpa di medici e di infermieri.

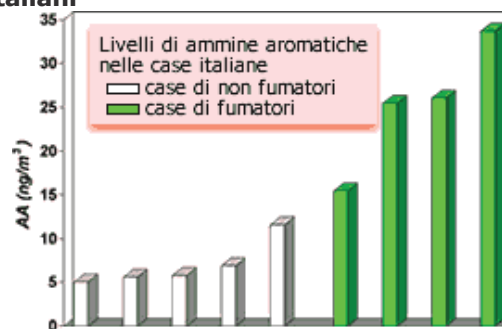
Nonostante gli effetti disastrosi del fumo, l'interruzione dell'abitudine porta ad una diminuzione del rischio, che ritorna a livelli normali dopo una sospensione di almeno 5 anni (figura 37). L'importante è arrivare prima dei tumori polmonari (figura 38) che cominciano assai prima dei cinquant'anni.

Figura 34
Livelli ambientali di ammine aromatiche in locali chiusi (Italia, prima della legge antifumo)



Rielaborato da dati di Dolara et al., *Chemosphere* 43, 355-361, 2001

Figura 35
Livelli di ammine aromatiche negli appartamenti italiani



Idem

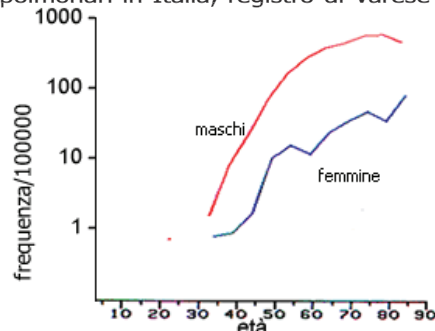
Figura 36
Una indagine demoscopica: dove si fumava in ospedale (Careggi Firenze, 2000)

	Sì	No
camere di degenza	2	50
ambulatori	6	38
bagni	11	34
soggiorni	14	30

Figura 37
Rischio relativo di tumore polmonare (RR) in funzione dell'età di cessazione del fumo

- età <35 anni RR=1
- età 35<60 anni RR=1.1
- età 60<75 anni RR=1.45

Figura 38
Purché si arrivi in tempo: incidenza per età dei tumori polmonari in Italia, registro di Varese



Rielaborato da European Environmental Agency
URL <http://www.environmentaldefense.org>

Il fumo di sigaretta ha effetti negativi anche sul feto e sulla gravidanza (**figura 39**) anche se non si può definire un teratogeno in senso stretto. Interessante è anche il fatto che l'abitudine al fumo dei padri provoca a distanza un rischio più alto di tumori cerebrali e di linfomi nella prole (**figura 40**).

Tra gli altri effetti indesiderati del fumo segnaliamo l'anticipo dell'invecchiamento cutaneo di circa 10 anni (**figura 41**). Uno dei meccanismi di quest'effetto è l'induzione di metalloproteinasi, enzimi che degradano le fibre elastiche e collagene del connettivo cutaneo (**figura 42**). Infatti è stato dimostrato, provocando una piccola lesione cutanea in volontari (vescica da suzione), che numerose proteine migrano nel liquido di suzione (vescica). Il contenuto di metalloproteinasi nelle vesciche da suzione cutanee è molto più alto nei fumatori (**figura 43**).

Figura 39

Altri affetti del fumo. Effetti sulla gestazione

- I figli delle forti fumatrici hanno un peso medio alla nascita minore (in media di 350 g rispetto alle non fumatrici)
 - La frequenza di cesarei è significativamente più alta
 - La frequenza di ricoveri in rianimazione dei neonati è più alta
- Habek et al., Fetal Diagn Ther 17, 367-372, 2002*

Figura 40

Effetti a distanza: i figli di padri fumatori hanno un RR più alto di

- tumori cerebrali (RR 1.22; CI, 1.05-1.40; 10 studi)
- linfomi (RR 2.08; CI, 1.08-3.98; 4 studi).

Boffetta et al., Environ Health Perspect 108, 73-82, 2002

Figura 41

Is skin ageing in the elderly caused by sun exposure or smoking?

The relative magnitudes of the effects of smoking and ageing are such that smoking 20 cigarettes per day increases the odds of lying above the median point for skin wrinkling to the same degree as about 10 years of chronological ageing (odds ratios of 3.87 and 4.05, respectively).

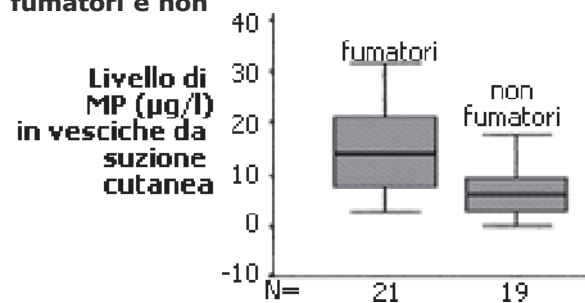
Leung e Harvey, Br J Dermatol 147, 1187-1191, 2002

Figura 42

Il fumo di sigaretta induce le metalloproteinasi e riduce alla metà la quantità di collagene sintetizzato dai fibroblasti

Figura 43

Variazioni delle metalloproteinasi (MP) in soggetti fumatori e non fumatori



Knuutinen et al., Br J Dermatol 146, 588-594, 2002

rox

lezione n. 17

Concetti generali sui pesticidi

L'idea di utilizzare prodotti chimici per controllare le malattie delle piante ed eliminare gli insetti dannosi è antica. Già in Omero si trovano cenni sull'uso dello zolfo per il controllo degli artropodi ed in epoca ancora più antica i cinesi (che a quanto pare hanno sempre inventato tutto prima di noi) conoscevano le proprietà insetticide dei prodotti arsenicali. I romani utilizzavano procedimenti che in qualche modo possono essere assimilati all'uso di pesticidi: Plinio raccomandava l'uso degli estratti di piante, come il sedo ed il marrobio, per le infestazioni agricole; Virgilio consigliava di trattare i semi con morchia di olive prima della semina per evitare le muffe.

Dopo il periodo romano bisogna arrivare al secolo XIX per trovare menzione degli effetti di sostanze chimiche sulle malattie delle piante. Ad esempio, lo zolfo ed il rame vengono usati dagli agronomi francesi come composti con effetti anticrittogamici sulla vite. Bisogna comunque arrivare al XX secolo perché si affermi l'uso di composti di sintesi organici in agricoltura. In Svizzera fu il chimico Müller a scoprire negli anni trenta gli effetti insetticidi di una sostanza clorurata di sintesi, il diclorodifeniltricloroesano o DDT. Più o meno nello stesso periodo furono introdotti i policlorodieni, l'esaclorobenzene e gli insetticidi organofosforici. Qualche anno più tardi vennero sintetizzati i carbammati. Alla fine della seconda guerra mondiale si scoprì che i fenossiacidi avevano proprietà diserbanti. Bisogna invece arrivare agli anni '50 perché vengano

sintetizzati composti organici ad azione fungicida selettiva (**figura 1**). In epoca più recente, una maggiore coscienza dei problemi ambientali causati dai pesticidi, ha portato alla ricerca e commercializzazione di composti più selettivi e, almeno potenzialmente, meno tossici (**figura 2**).

Alcune definizioni di nomenclatura sono riportate in **figura 3**. Il termine "pesticidi", più frequentemente utilizzato per descrivere questo gruppo di sostanze, è un neologismo derivato dall'inglese pest (peste o flagello). Il termine pesticidi è equivalente all'italiano "antiparassitari" e non comprende i diserbanti. In Italia ed in Francia viene spesso usato anche il termine di "Fitofarmaci", coniato dall'industria per assimilare i pesticidi ai farmaci per uso umano e veterinario; i farmaci (nella gran maggioranza dei casi) sono infatti caratterizzati da un buon indice terapeutico e da elevata purezza. Il termine di "fitofarmaci" non è meritato da molti pesticidi, che hanno scarsa selettività ed elevate impurezze. In Italia viene anche usato il termine di "Presidi sanitari", con il quale i pesticidi sono citati nelle disposizioni di legge.

La **figura 4** riporta componenti diversi che possono essere presenti in una formulazione di pesticidi. I componenti accessori sono di solito senza effetti tossici. Tuttavia eventuali contaminanti possono avere effetti importanti, come nel caso della contaminazione dei diserbanti 4,5-T e 4,5-D da diossine policlorurate.

Figura 1

Un pò di storia

- negli anni 1939-1940 P. Müller scopre le proprietà insetticide del DDT
- nello stesso periodo vennero scoperti l'HCH (esaclorocicloesano) e i policlorociclodieni
- sul finire degli anni '40 vennero introdotti gli inibitori della acetilcolinesterasi (insetticidi organofosforici) e, qualche anno più tardi, i carbammati
- nel 1943 venne evidenziata l'attività diserbante dei fenossiacidi
- nel corso degli anni '40 vennero scoperti i sali dell'acido ditiocarbammico
- negli anni '50 vennero proposti i derivati tioftalimmidici, primi fungicidi selettivi organici

Figura 2

Il diverso rapporto uomo-ambiente del periodo contemporaneo porta ad una attitudine critica nei confronti dei prodotti di vecchia generazione che vengono sostituiti con principi attivi con minore impatto ambientale e in generale:

- più costosi (soprattutto se coperti da brevetto)
- relativamente selettivi
- relativamente meno lesivi per l'ambiente. La loro tossicità nei confronti dell'uomo è generalmente bassa, ma non sempre

Figura 3

PESTICIDI

Composti destinati all'impiego in agricoltura allo scopo di proteggere le coltivazioni o le derrate alimentari dalle avversità biotiche o abiotiche

Sinonimi

- antiparassitari (non comprende i diserbanti)
- pesticidi (dall'inglese pest, peste, flagello, ha lo stesso significato di antiparassitari)
- presidi sanitari (termine usato dalla normativa italiana per indicare non solo antiparassitari e diserbanti ma anche i prodotti coadiuvanti)

Figura 4

Volontari (coformulanti)

- disperdenti
- bagnanti
- solventi
- adesivi

Involontari (fino al 50%!!)

- impurezze
- prodotti di degradazione

La **figura 5** riporta le classi più importanti di pesticidi e la **figura 6** i principali insetticidi. Negli anni 1960-80 i pesticidi raggiungono ogni angolo del mondo e la produzione e commercializzazione di nuove molecole si rafforza e si espande. Sono frequentemente segnalati effetti tossici acuti e cronici su popolazioni umane ed effetti ambientali sfavorevoli conseguenti all'uso di pesticidi (**figura 7**). Contemporaneamente nasce negli Stati Uniti d'America, per poi diffondersi nel mondo, il movimento ambientalista, che fa della lotta contro i pesticidi una delle proprie bandiere.

Studi condotti negli USA hanno dimostrato (**figura 8**), che le intossicazioni più frequenti si osservano negli addetti all'agricoltura, ma anche le intossicazioni domestiche o in ambiente cittadino sono frequenti.

I pesticidi sono classificati in diversi gruppi in funzione della loro tossicità: estremamente pericolosi, molto pericolosi, pericolosi, moderatamente pericolosi, difficilmente pericolosi (**figura 9**). La classificazione dipende dalle DL50 misurate nel ratto in seguito a esposizione orale o dermica, in forma solida o liquida. Le DL50 variano da pochi mg/kg fino a g/kg per le sostanze poco tossiche. L'esposizione umana può avvenire per molte vie, tra cui è importante la cutanea, in particolare nelle parti scoperte e non protette (**figura 10**).

Figura 5

Principali classi di fitofarmaci

- insetticidi
- fungicidi
- erbicidi

Figura 6

Insetticidi

- organoclorurati: diclorodifeniletani, ciclodieni, benzeni clorurati e cicloesani
- piretroidi
- anticolinesterasici: organofosforici e carbammati
- altri (nicotina, rotenone)

Figura 7

Intossicazioni da pesticidi registrate nel mondo:

- 1972: 500000 com/anno
- 1990: 25x10⁶ com/anno

Levine e Doull, Rev Environ Contam Toxicol 129, 29-50, 1992

Figura 8

Intossicazione da pesticidi in California (numero/anno)



Kilgore et al., International Toxicology Seminars, Bangkok, 1988

Figura 9

Classificazione dei pesticidi raccomandata dall'WHO in base al rischio

Classe	DL ₅₀ nel ratto (mg kg)			
	orale		dermica	
	solidi	liquidi	solidi	liquidi
Ia estremamente pericolosi	<5	<20	<10	<40
Ib molto pericolosi	5-50	20-200	10-100	40-400
II moderatamente pericolosi	50-500	200-2000	100-1000	400-4000
III poco pericolosi	>500	>2000	>1000	>4000
III + difficilmente pericolosi nell'uso corrente	>2000	>3000	—	—

Figura 10

Area della superficie del corpo esposta, in un individuo senza particolari precauzioni

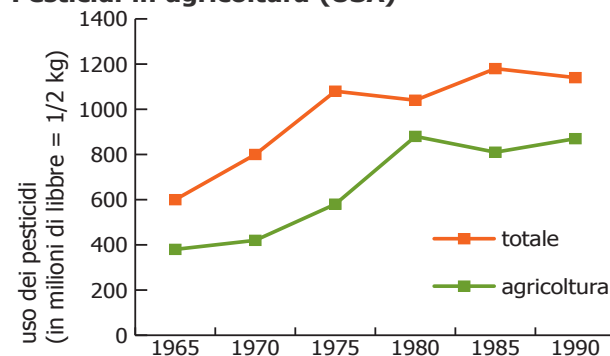
superficie scoperta	area della superficie
faccia	0.065 m ²
mani	0.065 m ²
avambracci	0.124 m ²

Batchelor e Walker, Arch Ind Hig Occup Health 10, 520-529, 1954

L'uso dei pesticidi è elevato in tutto il mondo, ma non sta crescendo, sia per il costo sia per l'opposizione di una parte dell'opinione pubblica (figura 11). Le tendenze dei consumi di pesticidi in Italia sono riassunte nella figura 12. Come si vede le quantità usate sono molto elevate e con modesta tendenza alla riduzione.

Figura 11

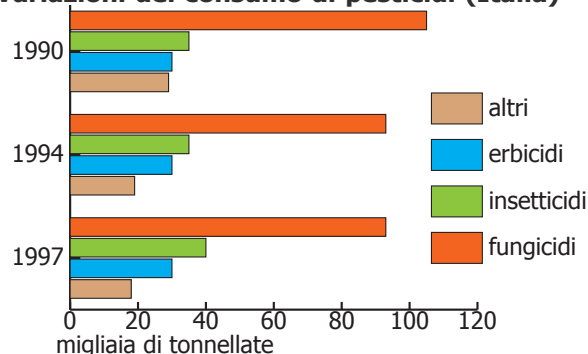
Pesticidi in agricoltura (USA)



Rielaborato da dati contenuti in <http://darwin.nap.edu/books/0309036275/html/453.html>

Figura 12

Variazioni del consumo di pesticidi (Italia)



Rielaborato da dati contenuti in http://www2.minambiente.it/sito/pubblicazioni/Collana_RSA/Collana_elenco.asp

L'opposizione ai pesticidi da parte di alcuni tossicologi deriva da considerazioni di vario genere, tra cui prevalgono quelle ambientali (i pesticidi modificano gli ecosistemi). Dal punto di vista di tossicità umana deve essere ricordato che la cosiddetta "tossicità selettiva" (misurata dal rapporto tra la dose letale nei mammiferi rispetto alla dose letale per gli insetti) è spesso non ottimale per questi composti (figura 13).

Figura 13

classe	composto	LD ₅₀ ratto/LD ₅₀ mosca
organoclorurati	DDT	59
	DDD	174
	Aldrin	27
organofosforici	parathion	4
	malathion	37.7
	dimetoato	390
carbammmati	aldicarb	0.175
	zectran	0.60
	mobam	10

Secondo le opinioni correnti i pesticidi aumentano la produzione agricola, per riduzione di agenti infestanti, di insetti e di malattie delle piante secondarie all'attacco di questi (figura 14). Tuttavia esistono anche opinioni diverse, rafforzate da una serie di dati sperimentali sulle cosiddette "fattorie organiche" o "biodinamiche", nelle quali per motivi di vario genere (ideologici o di salute) è stata fatta la scelta di abbandonare l'uso di prodotti chimici di sintesi. Vari studi hanno dimostrato che il profitto dei due tipi di fattoria (tradizionale e biologica) è essenzialmente analogo, essendo il lieve abbassamento della produzione per ettaro delle fattorie organiche o biodinamiche compensato da una diminuita spesa per l'acquisto di prodotti chimici. I dati sono stati confermati anche da importanti riviste internazionali (figura 15) per alcuni tipi di raccolti come le mele (figura 16). L'agricoltura biologica è così divenuta una parte importante dell'economia dei paesi sviluppati, ed è uno dei pochi settori ancora in continua crescita.

Figura 14
Stima degli effetti dei pesticidi sulla quantità di alcuni raccolti (1978)

raccolto	raccolto potenziale (t)	raccolto effettivo (t)	causa della perdita (%)		
			*	**	***
riso	715.800	378.645	10.6	9	27.5
mais	563.016	362.582	13	9.6	5.1
frumento	578.400	437.236	9.8	9.5	5.1
canna da zucchero	1.603.200	737.483	15.1	19.4	19.5
cotone	63.172	41.757	5.8	12.1	16

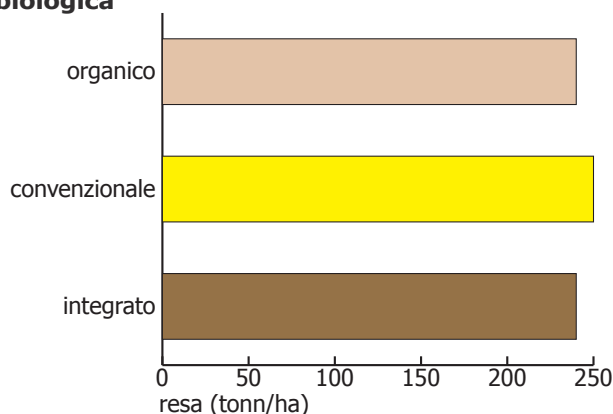
* erbe infestanti, ** malattie, *** insetti

GIFAP, Bulletin Volume 12, 1-10, 1986

Figura 15
Gli exploit dell'agricoltura "organica" fanno ancora notizia



Figura 16
Produzione di mele nell'agricoltura tradizionale e biologica



Reganold et al., Nature 410, 926-930, 2001

rox

lezione n. 18

Pesticidi anticolinesterasici, piretroidi, rotenone

Questi pesticidi sono vecchi come il DDT, ma la loro ininterrotta popolarità è spiegata dalla più breve persistenza ambientale rispetto ai pesticidi clorurati.

I più importanti componenti di questa classe sono gli insetticidi anticolinesterasici (**figura 1**). Uno schema della struttura del sistema colinergico è rappresentato in **figura 2**.

Il sistema colinergico è estremamente conservato nella evoluzione. Ciò spiega perché gli anticolinesterasici abbiano attività su organismi così apparentemente diversi e lontani nell'albero evolutivo (**figura 3**). Le differenze tra insetti e uomini sono argutamente discusse in un epigramma del grande scrittore tedesco Erich Kästner (**figura 4**).

La **figura 5** illustra la struttura funzionale dei recettori nicotinici e i loro bloccanti nel sistema simpatico, parasimpatico e nel muscolo striato. Fondamentale è la presenza di fibre colinergiche dirette dal midollo ai gangli parasimpatici, con recettori nicotinici, che controllano la funzione dei gangli adrenergici paravertebrali, e quindi del sistema adrenergico nel suo complesso. Ciò spiega alcune delle funzioni adrenergiche della nicotina (ad esempio la cardiostimolazione). Alcune fibre parasimpatiche si dirigono direttamente agli effettori del muscolo striato, dove esistono dei recettori nicotinici particolari, bloccati dal curaro. Invece le ghiandole (G), i muscoli lisci (ML) e il cuore (C), sono innervati direttamente dal sistema colinergico centrale, con recettori bloccati dall'atropina (**figura 6**).

Figura 1

Gli insetticidi anticolinesterasici bloccano la funzione della colinesterasi e quindi provocano una iperattivazione del sistema colinergico

Figura 2

Struttura del neurone colinergico

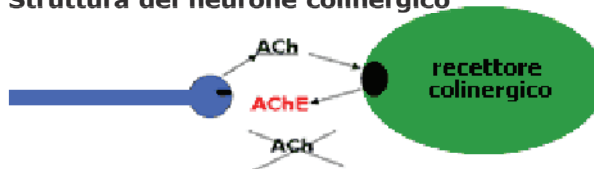


Figura 3

La struttura del **sistema colinergico** è perfettamente conservata da un punto di vista evolutivo



Figura 4

Differenze tra uomini e mosche secondo H. Kästner

Wie nun mal die Dinge liegen | Und auch wenn es uns missfällt | Menschen sind wie eintagsfliegen | An den Fenster dieser Welt | Unterschiede sind fast keine | Und war wär auch shon dabei | Nur die Fliege hat sechs Beine | Und der Mensch hat höchstens zwei.

Oggi son le cose losche | Ci potrà pur disgustare | Ma gli umani son come mosche | Fatti un giorno per durare | Differenze? Se a voi piaccia | E se pure fosse un vanto | La moschetta ha pur sei braccia | E noi invece due soltanto.

Figura 5

Struttura del sistema colinergico
recettori muscarinici e nicotinici

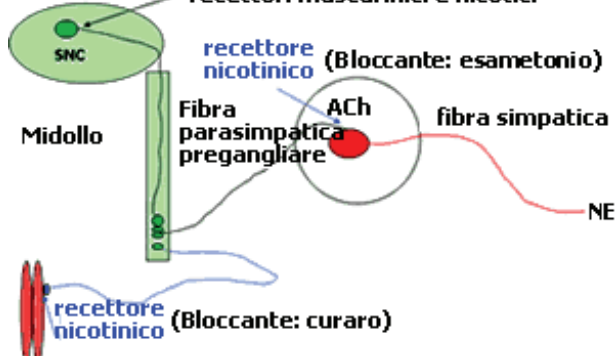
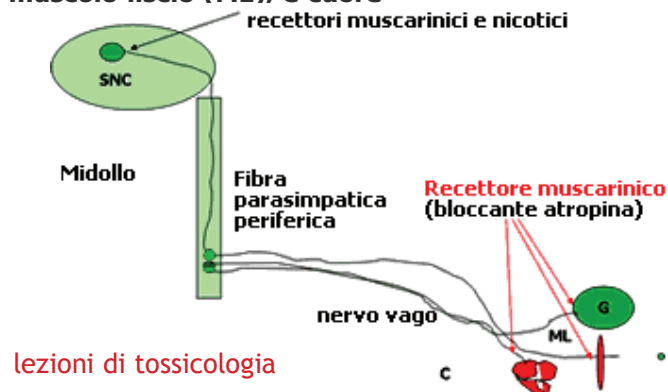


Figura 6

Struttura del sistema colinergico: ghiandole (G), muscolo liscio (ML), e cuore



TOX

lezioni di tossicologia

Il risultato di questa complessa articolazione (riassunto in tavola sinottica nella **figura 7**) è che un blocco della acetilcolinesterasi prova una attivazione complessiva del sistema colinergico: effetti atropino sensibili: lacrimazione, miosi, costrizione bronchiale, attivazione vagale a livello cardiaco (bradicardia e blocco), blocco dell'accomodazione oculare; effetti muscolari (bloccati dal curaro: fascicolazioni); effetti sul SNC (dove ci sono recettori nicotinici e muscarinici: eccitazione seguita da sonnolenza paralisi, morte) (**figura 8**).

Gli anticolinesterasici sono distinti in carbammati e organofosforici (**figura 9**).

I due più comuni tipi di organofosforici sono il parathion ed il dimetoato (**figura 10**). Comunemente usati sono anche il relativamente atossico Baygon e lo zectran (**figura 11**).

Figura 7
Struttura del sistema colinergico
recettori muscarinici e nicotici

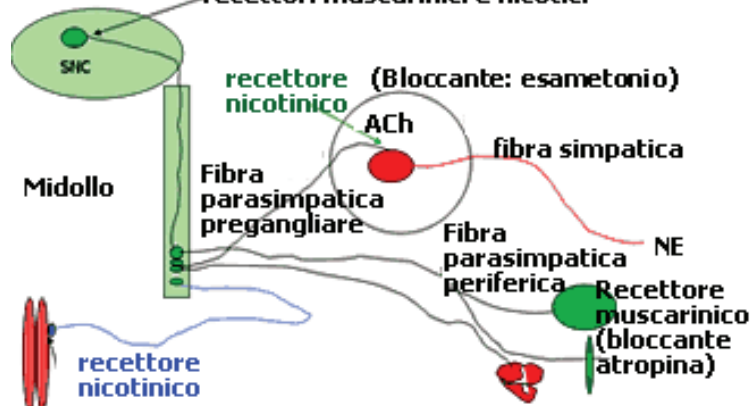


Figura 8
Insetti anticolinesterasici. Effetti tossici da inibizione dell'acetilcolinesterasi:

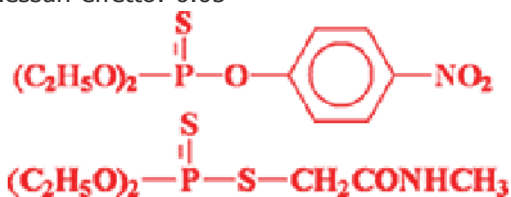
- attivazione delle fibre postgangliari parasimpatiche (lacrimazione, miosi, nausea, vomito, broncospasmo, ipersecrezione bronchiale bradicardia e ipotensione)
- attivazione dei recettori nicotinici scheletrici (fascicolazioni, paralisi muscolare)
- effetti diretti sul SNC (sonnolenza, coma, morte)

Figura 9
Anticolinesterasici

- organofosforici
- carbammati

Figura 10
Organofosforici
Parathion

DL₅₀ nel ratto (mg/kg/d): 13 (orale), 21 (dermica);
Nessun effetto: 0.05

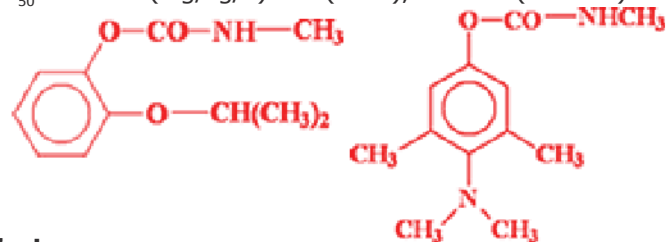


Dimetoato

DL₅₀ nel ratto (mg/kg/d): 215 (orale), 260 (dermica);
Nessun effetto: 0.4

Figura 11
Non organofosforici
Baygon (Propoxur)

DL₅₀ nel ratto (mg/kg/d): 83 (orale), > 2400 (dermica)



Zectran

DL₅₀ nel ratto (mg/kg/d): 37 (orale), 1500-2500 (dermica)

I pesticidi organofosforici inattivano la colinesterasi (ChE) perché al contrario del substrato fisiologico acetilcolina, vengono dissociati dall'enzima con lentezza (figura 12). La figura 13 riassume le caratteristiche tossicologiche fondamentali e le soglie di dose accettabile (ADI) di tre comuni organofosforici.

La figura 14 illustra la persistenza in ambiente acquoso ed a varie temperature di diversi organofosforici a pH diversi. È evidente che a temperature relativamente elevate (che si realizzano in campagna nei mesi estivi), ed a pH elevati, gli organofosforici sono assai labili. Ciò vale specialmente per le molecole relativamente nuove, che sono state sintetizzate avendo in mente i vantaggi ambientali di una rapida degradazione.

Gli organofosforici sono composti estremamente tossici e pericolosi da maneggiare. Anche la DL50 per via transcutanea è bassa, circa doppia rispetto alla DL50 per via orale, perché sono sostanze che facilmente permeano la barriera cutanea. Il rischio di intossicazioni per esposizioni professionali è quindi elevato. Anche la tossicità acuta dei carbammati p.o. è molto elevata. I carbammati invece, contrariamente agli organofosforici, tendono ad essere meno assorbiti per via transcutanea e questo li rende più maneggevoli in agricoltura. Un caso particolare è rappresentato dal propoxur (Baygon) che ha una DL50 per via orale di 83 mg/kg, mentre la DL50 per via dermica è > 2g/kg. Questo spiega il suo uso preferenziale come pesticida domestico. Similmente il carbaryl ha una DL50 per via orale di 850 mg/kg ed una DL50 per via dermica > 4g/kg.

Figura 12
Cinetica dell'idrolisi degli esteri

Composto (AB)	Formazione del complesso K1	Dissociazione del complesso k2
Substrati fisiologici (ACh)	rapida	rapida
Esteri organofosforici	rapida	lenta
Carbammati	rapida	lenta



Figura 13
Caratteristiche tossicologiche di alcuni organofosforici

Composto	DL ₅₀ nel ratto per os (mg/kg/d)	NOAEL	ADI
Parathion	13	0.05	0.005
Diazinon	108	0.1	0.002
Dimetoato	215	0.4	0.02

Figura 14
Persistenza dei pesticidi organofosforici in ambiente acquoso a varie temperature (giorni)

TEMPERATURA (°C), pH 1-5	Parathion	Disulfoton	Diclorvos
10	3.000	4.830	240
20	690	1.110	61
30	180	290	17
40	50	78	6
pH9, 30°	2.7	—	0.1

Kaur et al., Biomed Chromatogr 11, 22-24, 1997

I carbammati vengono decarbamilati nel fegato e successivamente idrossilati e coniugati con l'acido glicuronico e solforico. Una volta decarbamilati perdono la loro attività.

Oltre a queste azioni legate al meccanismo di azione principale, le diverse molecole possono avere effetti tossici legati a meccanismi diversi, viste le varie strutture molecolari che caratterizzano questi composti.

I piretroidi sono una classe di composti derivati dal piretro o sintetizzati in laboratorio con strutture chimiche che replicano i centri attivi del piretro ed hanno simile attività biologica. Alcune piretrine naturali sono ottenute dal fiore di il *Crisanthemum cinerarifolium* (figura 15), il cui fumo è utilizzato come insetticida dalle popolazioni africane e cinesi (figura 16). I primi piretroidi, essendo sostanze naturali, hanno avuto una certa popolarità anche in occidente (figura 17), dove sono una parte importante degli insetticidi commerciali (figura 18). Alcuni paesi africani sono tuttora produttori ed esportatori di piretro.

I composti naturali del piretro, o piretrine, (figura 19) sono abbastanza instabili e sono utilizzati prevalentemente come insetticidi domestici in fornellini vaporizzatori, spesso con l'aggiunta di un inibitore metabolico (il piperonil butossido) che blocca le monossigenasi e quindi aumenta la tossicità per gli insetti. Per ovviare alla relativa instabilità dei piretroidi naturali sono stati sintetizzati una serie di composti,

Figura 15
Crisanthemum cinerarifolium

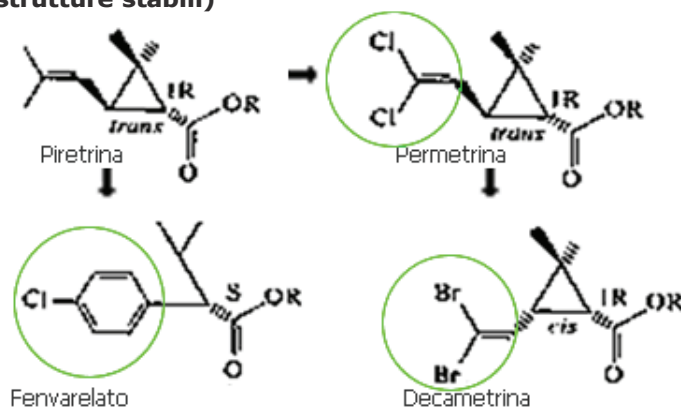


Figura 16
Pesticidi "alternativi": i piretroidi
il piretro è in uso in Cina da secoli ed è stato importato in Europa nel 1700

Figura 17
il piretro è benvisto dagli ambientalisti per la sua origine naturale (*Chrisanthemum cinerarifolium* e *Chrisanthemum coccineum*)

Figura 18
i piretroidi rappresentano il **30% del mercato mondiale di insetticidi**

Figura 19
Struttura delle piretrine (cerchiate, in verde, le strutture stabili)



genericamente chiamati "piretroidi di sintesi", che hanno strutture stericamente simili ai composti naturali, a volte con l'inserimento di gruppi chimici complessi nella struttura originale delle piretrine (figura 19). Questi piretroidi sono perciò erroneamente considerati "naturali".

In effetti taluni (come il fenvalerato o la decametrina) sono addirittura composti alogenati.

La figura 20 descrive il meccanismo di azione dei piretroidi e la 21 i sintomi dell'esposizione. La tossicità acuta per i mammiferi è bassa (figura 22). L'ampio uso dei piretroidi è legato alla bassa tossicità per i mammiferi, che li rende preferibili nell'uso domestico.

Il rotenone (figura 23) è un pesticida di origine naturale utilizzato in giardinaggio. Alcune delle sue caratteristiche tossicologiche sono riassunte nella figura 24. È un veleno della catena respiratoria, e provoca paralisi nervosa negli insetti e nei pesci (figura 25). La DL50 è elevata nell'uomo (figura 26), il che spiega il suo largo uso. Il rotenone è stato associato ad un alto rischio di Parkinson per esposizione cronica (figura 27).

Gli insetticidi in generale sono associati ad un maggiore rischio di Parkinson nei soggetti esposti, in particolare in soggetti con varianti meno funzionanti della glutation-transferasi P1 (GST-P1) (figura 27) e negli esposti cronicamente ad alte concentrazioni per motivi professionali (figura 28).

Figura 20

Pesticidi "alternativi": i piretroidi. Meccanismo di azione:

- aumento della costante di inattivazione dei canali del sodio
- inibizione della Ca-Mg-ATPasi e della calmodulina
- inibizione dei recettori GABA

Figura 21

Tossicità dei piretroidi nei mammiferi (ad alte dosi):

- ipereccitabilità
- ipersalivazione
- tremori

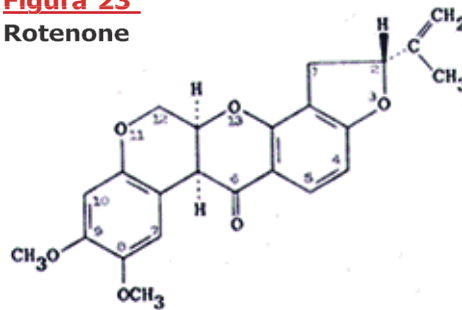
Figura 22

DL50 nei mammiferi

- permetrina 3800 mg/kg
- tetrametrina 1000 mg/kg
- deltametrina 31 mg/kg

Figura 23

Rotenone



Alcaloide presente nelle radici di *Derris elliptica* (sud est asiatico) e *Lonchocarpus* (sud America), insieme ad altri composti simili (rotenoidi)

Figura 24

Il rotenone. È impiegato per ridurre le popolazioni ittiche di laghi e bacini idrici. Presente in numerose formulazioni insetticide ed erbicide in commercio per uso domestico. Estremamente idrofobico. Provoca un'inibizione sistemica del complesso I della catena respiratoria

Figura 25

Il rotenone. Causa paralisi negli insetti e nei pesci per blocco nervoso Meccanismo: inibizione della respirazione cellulare

Figura 26

Il rotenone

Relativamente non tossico nell'uomo: dose orale letale stimata: 10-100 g/kg **Relativamente sicuro** perché biodegradabile e instabile alla luce e al calore

Figura 27

Il rotenone può provocare Parkinson

L'esposizione a rotenone (con altri pesticidi) è forse correlata all'insorgenza di Parkinson in individui geneticamente predisposti (GST-P1 polimorfi?)

Menegon et al., Lancet 352, 1344-1346, 1998

Figura 28

Parkinson da pesticidi

Rischio relativo (RR) di Parkinsonismo per esposizione professionale: 4.1 (CL: 1.37-12.24)

Gorel, Neurology 50, 1346-1350, 1998

rox

lezione n. 19

Pesticidi clorurati

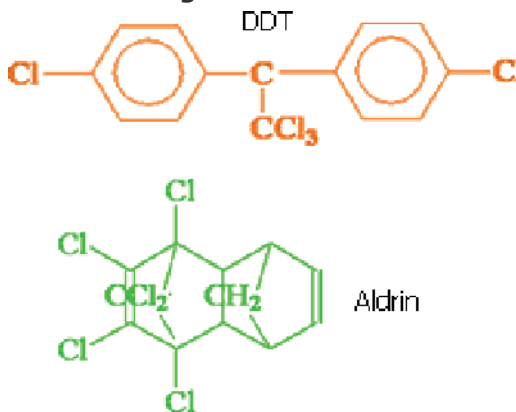
Gli insetticidi clorurati (o organoclorurati) sono un gruppo di sostanze caratterizzate dalla presenza di anelli organici di varia complessità sostituiti con cloro.

La **figura 1** schematizza le strutture più importanti e la loro tossicità. Come si può vedere i metaboliti del DDT (DDE e DDA) hanno una tossicità acuta equivalente a quella del DDT, mentre il dieldrin ha una tossicità assai minore. Le ADI sono molto basse (quella dell'aldrin è 50 volte più bassa rispetto al DDT); tuttavia esistono motivi che rendono tossicologicamente rilevanti anche livelli bassi di organoclorurati.

I valori di queste ADI sono tuttora in discussione e molti tossicologi credono che l'ADI consigliabile degli organoclorurati sia zero. Essendo gli organoclorurati composti di sintesi o contaminanti naturali, questo obiettivo non è irrealistico. Non a caso Greenpeace ha iniziato una campagna per un ambiente "chlorine free", che ovviamente non si riferisce al sale da cucina, ma in prima istanza agli organoclorurati di sintesi ed in particolare ai pesticidi clorurati.

I pesticidi clorurati sono strutture estremamente stabili a livello ambientale. La maggior parte degli enzimi metabolizzanti, infatti, non attaccano con facilità queste ingombranti strutture organiche cloro-sostituite (**figura 2**). Questa non è però una regola assoluta. Esistono infatti specie batteriche capaci di effettuare reazioni di dechlorazione. Molte di queste specie sono state selezionate per tentare la decontaminazione in situ di falde inquinate o per trattare rifiuti tossici (bioremediation). Tali stipiti

Figura 1
Insetticidi organoclorurati



Composto	LD ₅₀ nel ratto	Dose giornaliera "accettabile" ADI mg/kg/d
DDT	113	0.005
DDE	217	—
DDA	880	—
Aldrin	39	0.0001

batterici vengono adsorbiti a carbone attivo e l'acqua inquinata viene pompata attraverso il carbone fino ad una totale trasformazione dell'inquinante clorurato in cloro elementare e anidride carbonica. Va da sé che si tratta di procedimenti costosi ed indaginosi; molto meglio (e meno costoso) sarebbe prevenire l'inquinamento. I pesticidi clorurati hanno una persistenza media nel suolo superiore a 18 mesi. Il metabolita fondamentale del DDT dopo una mono-declorazione è il DDE (**figura 2**), sostanza anch'essa attiva in senso tossicologico. Per successiva declorazione ossidativa si formano dei composti acidi clorurati sull'anello benzenico (DDD e DDE). In condizioni favorevoli la declorazione può procedere oltre, ma la maggior parte degli enzimi dei mammiferi hanno una modesta capacità di declorazione; in conseguenza il DDT ed il DDE rimangono accumulati nel grasso degli organismi viventi senza ulteriori trasformazioni metaboliche.

Da tempo è noto che gli organoclorurati si accumulano anche nel grasso umano (**figura 3**). Il 96% dei campioni di grasso degli europei hanno residui dosabili di DDT, il 92% hanno residui di dieldrin, il 100% di esaclorobenzene, il 100% di PCB e frazioni superiori al 90% di esaclorociclosano (HCH). Se si misurano i livelli di organoclorurati nel grasso nei primi anni di vita di bambini venuti a morte per cause varie, i bambini allattati con latte artificiale hanno livelli di clorurati più bassi (**figura 4**) perché le mucche, mangiando erba e foraggi, ingeriscono alimenti meno contaminati rispetto agli umani, che sono onnivori ed al vertice della scala alimentare.

Figura 2
Principali vie di metabolizzazione del DDT

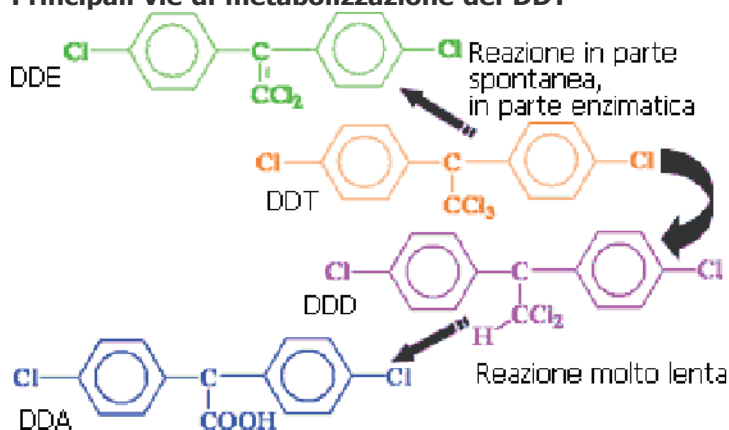


Figura 3
Frequenza media con cui si ritrovano organoclorurati nei tessuti umani

Sostanza	Percentuale
α-HCH	94
β-HCH	94
γ-HCH	98
Dieldrin	92
pp-DDT	96
op-DDT	46
HCB	100
PCB	100

Limite di rilevazione per il PCB = 0.1 ppm; limite di rilevazione per i pesticidi clorurati = 0.01 ppm; (ppm = mg/kg di grasso)

Harris et al., Chemosphere 43, 243-256, 2001

Figura 4
Quantità, in ppm, di organoclorurati presenti nel tessuto adiposo di 41 bambini europei in funzione dell'allattamento

Sostanza	Assunzione di latte materno	
	< 10 kg	> 10 kg
HCH	0.19	0.33
DDT	0.61	1.44
HCB	0.41	1.28
PCB	0.76	2.28

Idem

Molti pesticidi clorurati sono dosabili in comuni oli alimentari, data la loro lunga persistenza ambientale (figura 5).

L'elevata stabilità dei clorurati nei tessuti degli esseri viventi è alla base di un fenomeno da lungo tempo descritto, quello della bioconcentrazione (figura 6). Infatti i pesticidi clorurati, accumulati nel grasso delle specie più semplici, vengono ingeriti nella predazione lungo la catena alimentare, ed essendo poco metabolizzati, via via che si sale nella scala zoologica si attua una progressiva bioconcentrazione e accumulo nel grasso (infatti gli organoclorurati sono sostanze lipofile) (figura 7).

Il processo di bioconcentrazione è molto evidente nelle specie acquatiche e meno evidente nelle specie terrestri. Le concentrazioni di DDT nel grasso degli uccelli, anche se non elevata come per alcune creature marine, è sufficiente a spiegare le difficoltà riproduttive, legate ad una alterazione del metabolismo del calcio, che provoca la deposizione di uova con guscio non resistente alle sollecitazioni meccaniche (figura 8). Inoltre gli uccelli migratori mobilizzano le scorte di grasso in poche ore nel corso della migrazione; ciò porta alla liberazione di DDT e DDE, che possono raggiungere livelli plasmatici vicini a quelli a cui si osserva tossicità acuta negli insetti (tossicità neuromuscolare e nervosa). Questi episodi di tossicità acuta sono ovviamente fatali per gli uccelli in fase di stress (in inverno e nelle migrazioni).

Figura 5
Permanenza teorica di pesticidi ed erbicidi nell'olio di soia

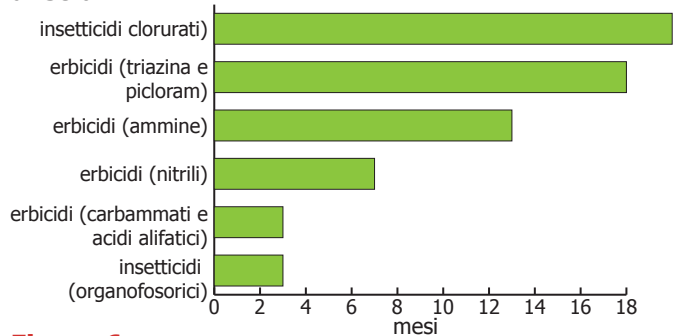
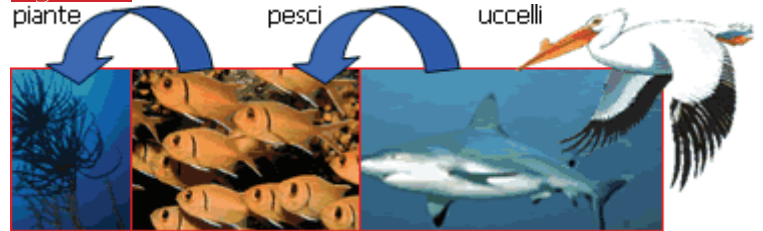


Figura 6



Catena alimentare. Rapporto che lega tra di loro i vari abitanti e componenti di un ecosistema (lago, stagno, ecc.)

Produttori: piante.

Consumatori:

- **I ordine: erbivori**
- **II ordine: piccoli carnivori**
- **III ordine: carnivori di lunga vita**

Figura 7

Bioconcentrazione del DDT

Organismo	Valore massimo nella specie osservata / valore ambientale
lombrico	73
lumaca	2.8
ostrica	70.000
pesce	829.000
verdura	0.08

DDT EPA-540/1-75-022, 24-62, 1975

Figura 8

Variazioni nello spessore delle uova di alcune specie di uccelli nord-americani (espresso come variazione percentuale rispetto al 1945)

Specie	Località	Variazione % dello spessore
Aquila calva	Texas	- 30
Cormorano dalla doppia cresta	Wisconsin	- 30
Falco pellegrino	California	- 26
Pellicano bianco	British Columbia	- 14

Idem

Questa complessa serie di fenomeni, riassunte nella **figura 9**, pienamente giustifica le storiche decisioni che hanno portato alla messa al bando del DDT in America prima e negli altri paesi sviluppati successivamente.

Un ulteriore effetto tossico cronico che contribuì a suo tempo alla decisione di bandire il DDT è relativo agli effetti cancerogeni; nei decenni successivi si è adottata una politica molto più lasca al riguardo (esistono decine di pesticidi cancerogeni tutt'ora in commercio). I dati della **figura 10** sono per noi storicamente importanti perché ottenuti da un ricercatore italiano. Lorenzo Tomatis ed i suoi collaboratori trattarono 881 topini CF1 confrontando la frequenza di tumori con quella di 224 controlli. La somministrazione del DDT era fatta per aggiunta agli alimenti. Gli animali furono trattati per 18 mesi con DDT alle dosi indicate. La somministrazione di DDT provocò effetti tossici aspecifici (eccesso di mortalità non tumore-specifica alla massima dose; infatti i numeri d'animali totali sono più bassi alla fine dell'esperimento). I tumori più frequentemente osservati negli animali trattati con DDT erano epatomi. I risultati indicavano una certa frequenza di tumori spontanei anche negli animali di controllo (22% nelle femmine e 3.6% nei maschi). Tuttavia tale frequenza era significativamente superiore negli animali trattati con DDT (79% nei maschi e del 76% nelle femmine).

Figura 9

Sommario degli effetti ambientali avversi del DDT

- gli uccelli possono mobilizzare quantità letali di DDT in periodi di stress associati all'utilizzazione delle riserve adipose
- Il DDT, interferendo con il metabolismo del Ca, causa una riduzione dello spessore del guscio delle uova che può portare a morte dell'embrione
- Il DDT è bioaccumulato.
- Il DDT può avere effetti letali per artropodi, molluschi e pesci
- Il DDT provoca deficit riproduttivi nei pesci

DDT EPA-540/1-75-022, 24-62, 1975

Figura 10

Effetto della somministrazione di diverse concentrazioni di DDT, nell'arco dell'intera vita di topi CF1

- Aumento della mortalità dopo la 60esima settimana di vita, nei topi trattati con 250 ppm, sia nei genitori che nella prole

Gruppo	Maschi	Femmine
0 ppm	22%	4%
2 ppm	46%	4%
10 ppm	50%	9%
50 ppm	53%	12%
250 ppm	80%	77%

Turusov et al., J Natl Cancer Inst 51, 983-987, 1973

Il meccanismo dell'azione tossica del DDT sugli insetti è molteplice (**figura 11**). Il DDT, ad alte dosi, provoca una alterazione della conduttanza di membrana al Na e al K ed una alterazione della funzione della Na-K-ATPasi e della Ca-ATPasi. Questi effetti a livello della cellula nervosa si associano ad ipereccitabilità di membrana, fino al blocco della conduzione. È possibile che questi effetti spieghino anche alcune azioni tossiche osservate nei mammiferi. Infatti il DDT può provocare nei mammiferi parestesie ed atassia, tremori, iperreflessia, contrazioni miocloniche e, a dosi più elevate, convulsioni.

I pesticidi clorurati sono i più persistenti dei pesticidi e quindi hanno un maggiore impatto ambientale. Tuttavia i pesticidi clorurati, banditi nei paesi industrializzati, sono utilizzati in molti paesi del terzo mondo per la lotta alle zanzare (**figura 12**). Perciò, in questi paesi, molti alimenti di uso corrente sono contaminati dal DDT (**figura 13**).

La massa di informazioni sul DDT e gli altri organoclorurati è sufficiente per un quadro a bieche tinte degli effetti tossici di questi composti. Due recenti articoli gettano ulteriore luce su effetti ambientali in precedenza mai dimostrati.

In un lavoro recente (**figura 14**) la distribuzione globale di 22 organoclorurati è stata studiata nella corteccia di alberi prelevati 90 siti diversi nel mondo. Come abbiamo visto nella maggior parte dei paesi industrializzati l'uso del DDT è stato bandito da decenni. La ricerca dimostra che gli organoclorurati sono invece presenti nella corteccia degli alberi di

Figura 11 Meccanismi d'azione degli insetticidi organoclorurati e del DDT a livello della membrana neuronale

- Riduzione del trasporto del K⁺
- Inattivazione della chiusura dei canali del Na⁺
- Inibizione della Na⁺/K⁺ ATPasi e la Ca²⁺/Mg²⁺ ATPasi
- Inibizione della capacità della calmodulina di legare il Ca
- Riduzione la velocità di ripolarizzazione
- Aumento della sensibilità dei neuroni a piccoli stimoli che altrimenti non sarebbero efficaci
- Ipereccitabilità di membrana fino al blocco della conduzione

Figura 12 Uso del DDT nei programmi di prevenzione dalla malaria nei paesi sud-americani (1993-1994)

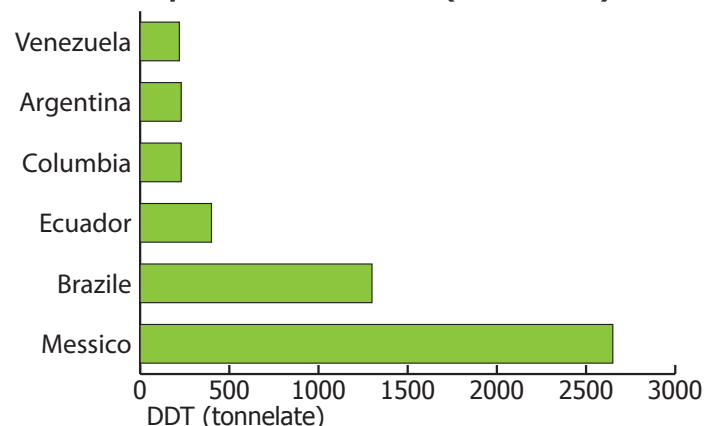
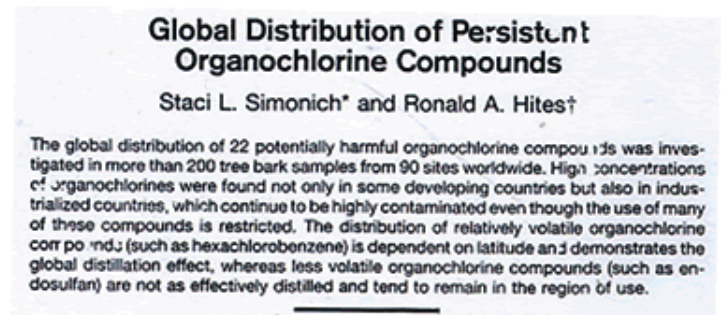


Figura 13 DDT negli alimenti del Messico

Alimento	% di campioni positivi
latte	43
carne	10

Lopez-Carillo et al., Environ Health Perspect 104, 584-588, 1996

Figura 14



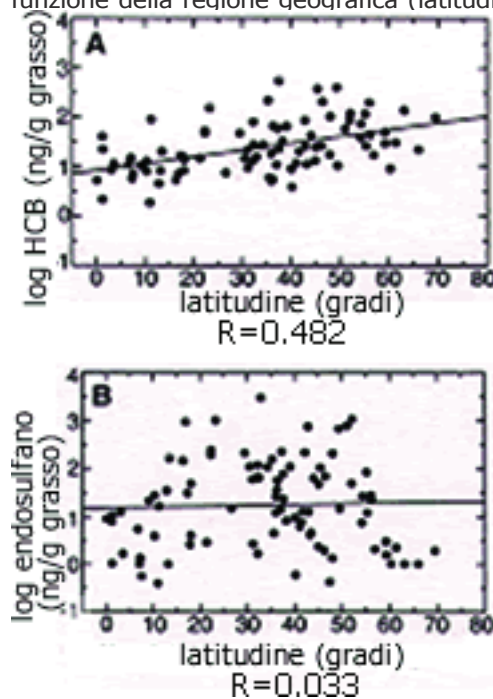
Simonich et al., Science 269, 1852-1862, 1995

tutti i paesi del mondo, inclusi gli industrializzati. La concentrazione di pesticidi è funzione della latitudine (ciò si eleva progressivamente passando dall'equatore ai poli, **figura 15**).

I clorurati volatili, come l'esaclorobenzene, sono anzi più alti nei paesi temperati e freddi (come il Canada ed i paesi scandinavi) (**figura 16**) dimostrando una sorta di distillazione planetaria di questi composti, che vaporizzano nei paesi caldi e ricondensano precipitando nei paesi freddi, che sono spesso i più industrializzati (**figura 17**).

Articoli recenti sollevano il dubbio che i pesticidi clorurati possano anche avere un effetto estrogeno-mimetico. La maggior parte della comunità scientifica concorda sulla potenziale pericolosità a livello planetario di queste sostanze (**figura 18**).

Figura 15
Concentrazione, in ng, di HCB (A) ed endosulfano II (B) nella corteccia degli alberi, espressa in funzione della regione geografica (latitudine)



Simonich et al., Science 269, 1852-1862, 1995

Figura 16
Distribuzione del DDT nella corteccia degli alberi



Idem

Figura 17



Figura 18
Conclusione: in tossicologia ambientale è necessario al pensare al mondo non all'orto di casa propria

rox

lezione n. 20

Bifenili, diossine, benzofurani policlorurati e polibromurati

Le diossine policlorurate PCDD, i benzofurani policlorurati (PCDF) ed i bifenili policlorurati (PCB) (**figura 1**) sono una serie di composti organici alogenati stabili e altamente tossici, contaminanti universali dell'ambiente e degli organismi viventi; derivano dai processi di combustione e dalla produzione di sostanze organiche alogenate nell'industria chimica (le formule di alcuni bifenili e diossine sono riportate nella **figura 2**).

La loro presenza nell'ambiente è nota da decenni, ma sono venuti alla ribalta internazionale in seguito ad episodi di intossicazione dei veterani americani per l'uso di erbicidi contaminati in Vietnam, e dopo l'incidente dell'ICMESA vicino a Milano (1976) dovuto ad un errore nella produzione di un diserbante clorurato in una sussidiaria della Svizzera Hoffmann La Roche.

Le diossine, i benzofurani ed i bifenili policlorurati sono molecole organiche che si formano facilmente in una serie di processi chimici. Gli anelli benzenici che le costituiscono, uniti o no da un atomo di ossigeno (**figura 3**) possono essere coniugati in varie posizioni con molecole di cloro, ma anche con molecole di bromo. Accanto a PCDD, PCDF e PCB esistono quindi PBDD e PBDF (polybrominated dibenzodioxines or dibenzofuranes) e PBB (polybrominated biphenyls). In molti processi di combustione si formano mescolanze complesse di questi composti che contengono sia bromo che cloro.

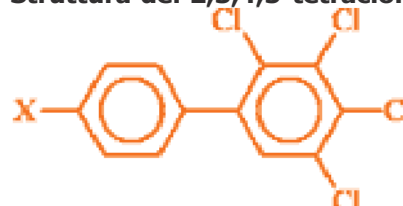
Figura 1

Famiglia delle diossine e dei benzofurani policlorurati

- PCDD e PBDD (dibenzodiossine policlorurate e polibromurate)
- PCDF e PBDF (dibenzofurani policlorurati o polibromurati)
- PCB e PBB (bifenili policlorurati e polibromurati)

Figura 2

Struttura del 2,3,4,5-tetraclorobifenile



Struttura della 2,3-diclorodibenzo-p-diossina

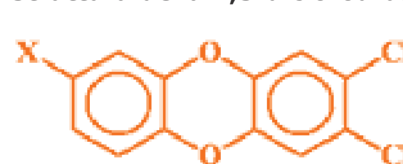
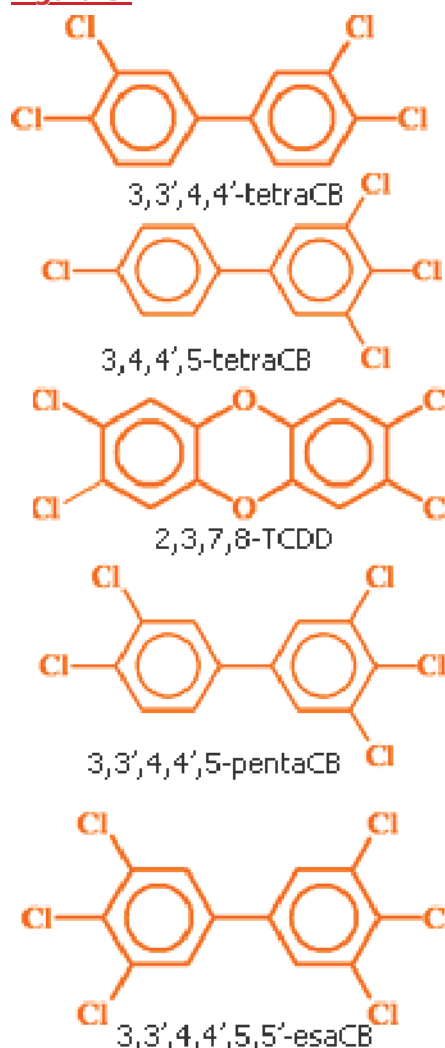


Figura 3



Mentre le PCDD sono inquinanti e sottoprodotti di processi chimici vari, i PCB sono stati sintetizzati dall'industria chimica per usi industriali (**figura 4**). L'uso diversificato dei PCB dipende dal fatto che sono prodotti economici, che non bruciano, che non si mescolano con l'acqua, fortemente viscosi e stabili in un range di temperature elevato. L'alta costante dielettrica e stabilità al calore spiega il loro uso come isolanti elettrici e come scambiatori di calore all'interno dei trasformatori. Le gravi manifestazioni tossiche osservate negli operai addetti alla lavorazione dei PCB hanno portato al loro bando. La produzione di PCB si è arrestata, ma la contaminazione ambientale è rimasta elevata a causa della persistenza di questi composti ed alla loro formazione in una varietà di processi industriali (**figura 5**).

Le PCDD ed i PCDF sono presenti in tracce in numerosi composti chimici e si formano nel corso delle reazioni di clorazione per la sintesi di altri composti (2,4,T, 2,4,D, erbicidi fenileteri, pentaclorofenolo, triclorofenolo, esaclorofene, dicamba, clorobenzene). È legittimo attendersi una produzione di PCDD e PCDF tutte le volte che si bruciano alcuni precursori (PCB, pentaclorofenolo, benzeni clorurati), o si bruciano insieme sostanze contenenti anelli organici semplici (ad esempio le lignine) con materiali ad alto contenuto di cloro (come il PVC) o di bromo (**figura 6**). Inattesa, ma non meno importante, è stata la segnalazione negli ultimi anni della produzione di PCDD negli incendi boschivi (**figura 7**).

Figura 4

PCB

- **Usi:** diluenti, plastificanti, dielettrici, coformulanti, ignifughi, lubrificanti, sigillanti, scambiatori di calore, oli da taglio, adesivi
- **Caratteristiche:** stabilità, immiscibilità

Figura 5

Origini comuni dei PCDD e PCDF

- Inceneritori di rifiuti solidi urbani
- Fumi di scarico autoveicoli
- Combustione rifiuti industriali
- Combustioni incontrollate ed incendi boschivi
- Contaminazione di prodotti chimici e pesticidi

Figura 6

Teorie sulla formazione dei PCDD e dei PCDF negli inceneritori:

- Presenza come tali nei rifiuti
- Produzione di precursori (PCB, pentaclorofenoli, benzeni clorurati)
- Produzione da altri materiali (PVC, materie plastiche, cloro inorganico con lignine)

Figura 7

PCDD 59 kg prodotti da incendi forestali naturali nel solo Canada

Sheffield et al., Chemosphere 14, 811-820, 1985

I policlorurati hanno potenza tossica variabile e effetti simili, in funzione delle sostituzioni con alogeni degli anelli laterali (**figura 8**). I più attivi sono quelli alogenati in posizione 3,4-7,8. I loro effetti tossici non richiedono metabolizzazione, che è molto scarsa nei mammiferi (**figura 9**). Gli effetti tossici dopo esposizione cronica sono riassunti dal termine: waisting syndrome (sindrome di deperimento) caratterizzata da perdita di peso nonostante una alimentazione normocalorica.

La tossicità riproduttiva si evidenzia a livelli di dosi molto basse in tutte le specie, ed è notevolmente maggiore nella scimmia rispetto ai roditori (**figura 10**). Le manifestazioni embriotossiche più frequenti sono il rallentamento della crescita fetale, la palatoschisi e l'atrofia timica. Nei neonati che sopravvivono si hanno più tardi alterazioni della funzione sessuale, con diminuzione di peso delle vescicole seminali e della prostata (maschi) ed alterazioni del comportamento sessuale sia nella femmina che nel maschio. La TCDD è anche cancerogena in numerose specie di mammiferi (**figura 11**).

Figura 8

Relazione struttura-attività nei PCDF: effetto della clorurazione in 4 diverse posizioni sulla molecola del dibenzofurano

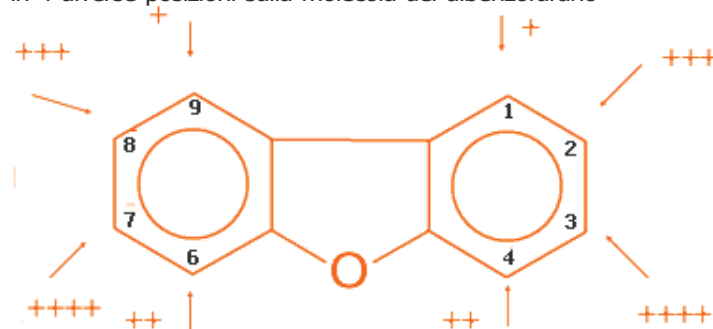


Figura 9

Tossicità dei PCDD, PCDF e PBB

- La tossicità non richiede attivazione metabolica
- La tossicità è simile a quella dei TCDD ma con attività minore
- La bio-accumulazione è maggiore per i derivati 2'-3'-7'-8'
- Tutti i derivati 2'-3'-7'-8' legano il recettore Ah

Figura 10

Relazione tra mortalità prenatale e esposizione a TCDD durante la gestazione

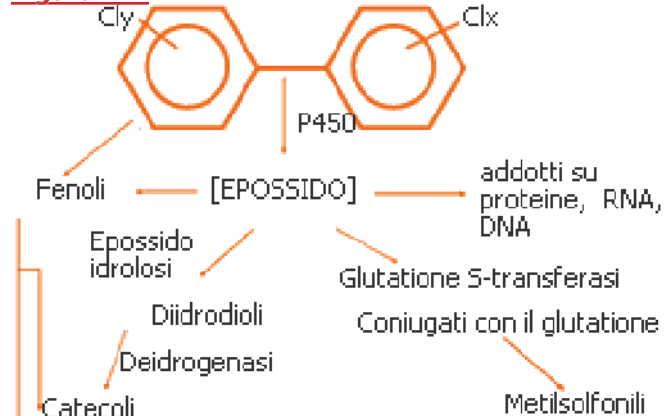
Specie	Dose di TCDD giornaliera (µg/kg, day)	Dose cumulativa (µg/kg)	Effetti tossici sulla madre	% mortalità prenatale
Scimmia Rhesus	0	0	-	25
	0.2	0.2	-	25
	1	1	+	81
	5	5	+	100
Coniglio New Zealand	0	0	-	7
	0.1	1	-	12
	0.25	2.5	+	42
	0.5	5	+	22
	1	10	+	100
Ratto Sprague Dawley	0	0	-	25
	0.03	0.3	-	21
	0.125	1.25	-	15
	0.5	5	+	41
	2	20	+	95
Topo CD-1	0	0	-	7
	25	250	-	6
	50	500	-	13
	100	1000	-	14
	200	2000	+	87
	400	4000	+	97

Couture et al., Teratology 42, 619-627, 1990

Figura 11**Studi di cancerogenesi sperimentale sui TCDD**

Autore, specie, dose	Organo nel quale si sviluppano tumori
Ama et al., Ann N Y Acad Sci USA 320 397-404, 1979., 1997 Ratti Sprague Dawley 0.001-0.1 µg/kg	Fegato e naso
NTP, 1982 Ratti Osborne Mendel Topi B6C3F1 5-250 ng/kg	Fegato e tiroide
Van Miller et al., Food Cosmet Toxicol 320, 419-425, 1979 Ratti Sprague Dawley 0.003-500 µg/kg	Fegato e polmoni
Toth et al., Prog Biochem Pharmacol 14, 82-93, 1978 Topi Swiss H Riop 0.007-µg/kg	Fegato
Della Porta et al., Tumori 30, 99-107, 1987 Topi B6C3F1 1-60 µg/kg	Timo e fegato

Le PCDD e PCDF sono sostanze estremamente persistenti, nonostante una lenta epossidazione e coniugazione (figura 12). Per questo la loro emivita è estremamente lunga (figura 13).

Figura 12**Figura 13****2, 3, 7,8-TCDD**

- Emivita nel suolo: 10 anni
- Accumulazione tissutale: fegato e grasso
- Emivita nei mammiferi: 11 giorni-1 anno
- Emivita nell'uomo: circa 8.2 anni

Figura 14**Immune System Impairment and Hepatic Fibrosis in Mice Lacking the Dioxin-Binding Ah Receptor**

Pedro Fernandez-Salguero, Thierry Pineau, David M. Hilbert, Timothy McPhail, Susanna S. T. Lee, Shioko Kimura, Daniel W. Nebert, Stuart Rudikoff, Jerrold M. Ward, Frank J. Gonzalez*

The aryl hydrocarbon (Ah) receptor (AHR) mediates many carcinogenic and teratogenic effects of environmentally toxic chemicals such as dioxin. An AHR-deficient (*Ahr*^{-/-}) mouse line was constructed by homologous recombination in embryonic stem cells. Almost half of the mice died shortly after birth, whereas survivors reached maturity and were fertile. The *Ahr*^{-/-} mice showed decreased accumulation of lymphocytes in the spleen and lymph nodes, but not in the thymus. The livers of *Ahr*^{-/-} mice were reduced in size by 50 percent and showed bile duct fibrosis. *Ahr*^{-/-} mice were also nonresponsive with regard to dioxin-mediated induction of genes encoding enzymes that catalyze the metabolism of foreign compounds. Thus, the AHR plays an important role in the development of the liver and the immune system.

Fernandez-Salguero et al., Science 268, 722-726, 1995

Figura 15**Alterazioni patologiche nei topi *Ahr*^{-/-}**

- Elevata mortalità fetale
- Mancata risposta agli induttori enzimatici
- Diminuita dimensione del fegato e fibrosi peribiliare
- Alterazioni delle funzioni linfocitarie

Idem

La funzione del recettore Ah, che lega questi composti, non è perfettamente nota, ma i topi C57bl/6N, knockout per il gene che codifica per questo recettore A (detti topi "Ahr-") (figura 14) muoiono precocemente. Quelli che sopravvivono hanno deficienze del sistema immunitario, caratterizzate dalla perdita della capacità fagocitante della milza e dei linfonodi nei confronti dei linfociti, che non riescono a colonizzare gli organi linfatici. Inoltre questi animali presentano un fegato di dimensioni ridotte è affetto da fibrosi biliare (figura 15).

Le PCDD e PCDF hanno una elevata reattività per il recettore Ah (figura 16). Uno degli effetti della interazione con questo recettore è l'induzione della sintesi di monossigenasi. Ricordiamo che la proteina-recettore Ah è la stessa che media gli effetti induttivi degli IPA. Ricerche fondamentali degli anni '70 hanno chiarito che solo gli animali con un recettore normale (cioè con una coppia di geni detta Ahb-Ahb) rispondono con una palatoschisi della prole alla somministrazione di questi composti (figura 17).

Il recettore Ah è quindi una struttura fondamentale nella regolazione della proliferazione degli epatociti e della funzione immunitaria, agendo su meccanismi cellulari ancora in parte ignoti.

Il legame irreversibile del recettore Ah con i PCDD o PCDF, diverte questa proteina dalle sue normali funzioni di regolazione. Si spiegherebbero in tal modo i multiformi effetti tossici di questo gruppo di sostanze su organi e sistemi, ed in particolare la depressione immunitaria e l'alterazione del metabolismo epatico. La sintomatologia tossica dei composti clorurati di questa classe è simile e la loro potenza tossica è variabile, in funzione della posizione e del numero dei sostituenti alogenati. La maggior parte delle analisi ambientali rivela la presenza di isomeri con tossicità diversa. Ciò ha reso necessario normalizzare gli effetti con i cosiddetti "equivalenti tossici", toxic equivalent factors (TEF). Come illustra la figura 18 è possibile calcolare dei valori di TEF, facendo il confronto fra i composti più tossici, come la 3,4,7,8-tetraclorodibenzodiossina (TCDD) e un determinato isomero di

Figura 16
Interazione del TCDD con il recettore Ah

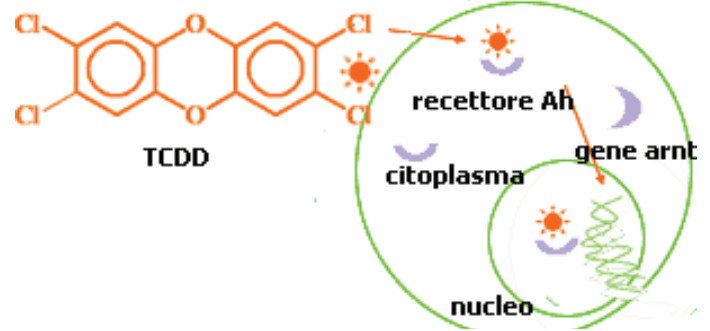


Figura 17
Genetica del recettore Ah e malformazioni

	Recettore	Palatoschisi
topi C 57 B L / 6	Ahb/Ahb	54%
D B A 2	Ahd/ Ahd	2%
topi B 6 D 2 F 1 (C57B1xDBA/2)	Ahb/Ahd	13%

Schum et al., Teratology 20, 365-376, 1979

Figura 18
Diossine (PCDD)

Isomero	TEF (EPA)
2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-Pe-CDD	0.5
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.04
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.04
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.04
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.001

Dibenzofurani (PCDF)

Isomero	TEF (EPA)
2,3,7,8-TCDF	0.1
1,2,3,7,8-Pe-CDF	0.1
2,3,4,7,8-PeCDF	0.1
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.01
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.01
1,2,3,6,7,8-HpCDF	0.01
2,3,4,6,7,8-Hx-CDF	0.01
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.001
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.001

questo gruppo, utilizzando un marcatore biologico (ad esempio la potenza di dare malformazioni, l'induzione di monossigenasi, l'induzione della wasting sindrome).

Con questi valori di ED50 si sono fatti dei confronti con la molecola più attiva del gruppo che è stata presa come punto di riferimento con un valore arbitrario uguale a 1. L'attività di tutti gli altri composti è stata quindi espressa in frazioni di 1. Per valutare la tossicità di una miscelazione si moltiplicano le concentrazioni di ogni PCDD o PCDF per il valore di TEF (detto anche TEQ toxic equivalent quotient) ottenendo delle misure di tossicità di una miscelazione espressa in TCDD equivalenti. Ad esempio, l'assunzione giornaliera con la dieta è espressa in TEF o TEQ (figura 19) e così pure i livelli nel latte materno (figura 20). I livelli più bassi nel latte si sono determinati in Ungheria, ed i più alti in Belgio (figura 21).

Data la persistenza e la tossicità i livelli di queste sostanze ritenuti sicuri sono molto bassi; si sono avuti incidenti per contaminazione di mangimi animali nei quali si sono raggiunti nella carne livelli di TCDD molto elevati (figura 22).

A parte gli inceneritori ed i processi industriali anche il traffico automobilistico è una sorgente, sia pur minore, di policlorurati (figura 23). Infatti, un tossicologo svedese (Rappe) ed i suoi collaboratori hanno dimostrato che si formano diossine policlorurate anche all'interno dei motori a scoppio, se si utilizzano additivi clorurati. Quasi tutte le PCDD sono dosabili a livelli di fmole/m³ nell'aria urbana (figura 24).

Figura 19

Assunzione tollerabile di TCDD al giorno

- Giappone 5-10 pg/kg bw
- WHO 1-4 pg/kg
- Germania 1 pg/kg

Figura 20

Livelli di TCDD nel latte materno (Europa)

- Limite inferiore: Ungheria (8 pg/g di grasso)
- Limite superiore: Belgio (28 pg/g di grasso)

Assunzione di TCDD con il latte materno 160 ml/kg/d = 640 ml/4 kg (26 g di grasso)

- Limite inferiore: 208 pg (10 volte il valore soglia ammissibile secondo la WHO)
- Limite superiore: 728 pg (36 volte il valore soglia della WHO)

Da European Environmental Agency
URL <http://www.environmentaldefense.org>

Figura 21

Concentrazione di diossina nel latte umano in diversi paesi europei

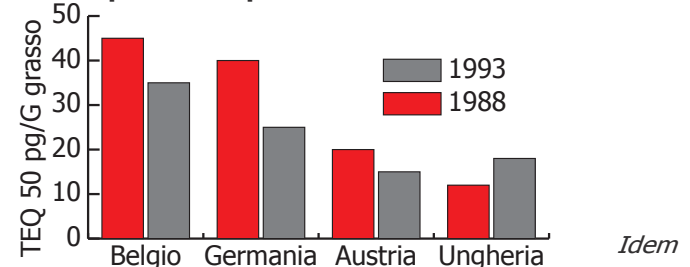


Figura 22

"Incidente diossina del 1999": contaminazione da TCDD nel cibo belga

- **Carne di pollo:** 850 pg/g di grasso; 1/4 di pollo ~ 300 grammi = 36 g di grasso. TCDD = 30 ng (100 volte il limite fissato dalla WHO)
- **Uova:** 470 pg/g di grasso; 1 uovo = 50 grammi = 6 grammi di grasso. TCDD = 2.8 ng (10 volte la soglia WHO)

Covaci et al., Chemosphere 47, 207-217, 2002

Figura 23

Livelli di PCDD e di PCDF nel gas di scarico di veicoli a benzina normale (ng emessi ogni 24.8 km)

2,3,7,8-tetraCDF	0.6
TetraCDF totali	10-200
2,3,7,8-tetraCDD	0.05-0.3
TetraCDD totali	3-90
1,2,3,7,8-pentaCDF	0.5-4.6
2,3,4,7,8-pentaCDF	0.3-3.9
PentaCDF totali	5-46
1,2,3,7,8-pentaCDD	0.5-3.5
PentaCDD totali	6-98
TCDD-Equivalenti	0.8-13

Turrio-Baldassari, Chemosphere 59, 1517-1524, 2005

La presenza di veicoli che continuano ad usare antidetonanti clorurati e bromurati può essere all'origine di questa contaminazione, ma è anche possibile che sia provocata, almeno in parte, dalla combustione incontrollata di materiale organico (fuochi di sterpaglie e di rami).

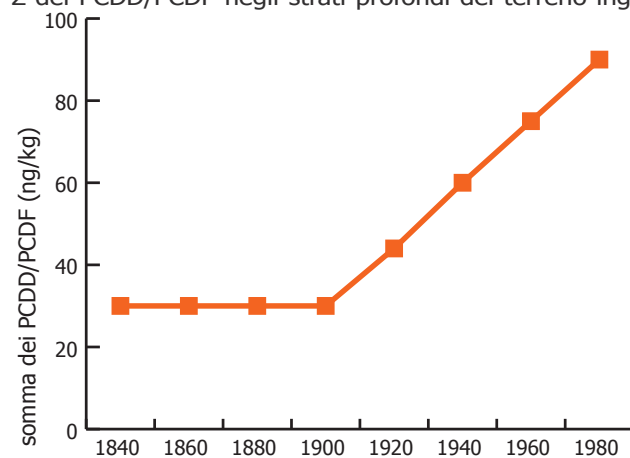
Dati ottenuti in Inghilterra e negli Stati Uniti, dimostrano che nel terreno non agricolo e nei fanghi dei laghi (che conservano la memoria storica dell'inquinamento dell'aria, perché mantengono inalterate le particelle deposte dall'aria inquinata), i livelli di PCDD/PCDF erano molto bassi prima dell'espansione dell'industria chimica del Novecento (figura 25). Inoltre le zone di deposizione massima nei sedimenti dei laghi corrispondono agli anni di maggiore produzione di pesticidi clorurati (DDT, mirex) (figura 26).

Figura 24
Concentrazioni di PCDD e PCDF nell'aria di Roma

	MIN		MAX
2,3,7,8-tetraCDD		<8*	
1,2,3,7,8-pentaCDD		>15**	
1,2,3,4,7,8-esaCDD	<10		13
1,2,3,6,7,8-esaCDD	12		58
1,2,3,7,8,9-esaCDD	44		84
1,2,3,4,6,7,8-eptaCDD	205		580
octaCDD	604		870
2,3,7,8-tetraCDF	45		65
1,2,3,7,8-penta CDF	11		25
2,3,4,7,8-pentaCDF	8		38
1,2,3,4,7,8-esaCDF	84		180
1,2,3,6,7,8-esaCDF	22		67
2,3,4,6,7,8-esaCDF	47		83
1,2,3,7,8,9-esaCDF	<8		24
1,2,3,4,6,7,8-eptaCDF	220		600
1,2,3,4,7,8,9-eptaCDF	<8		40
octaCDF	120		240

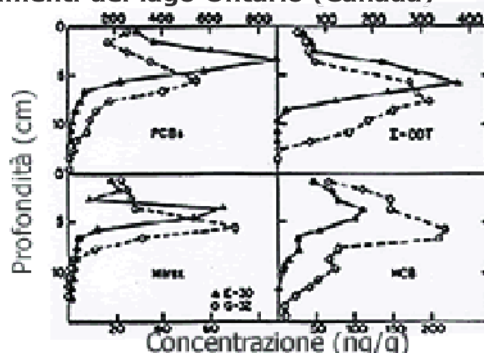
Turrio-Baldassari, Chemosphere 59, 1517-1524, 2005

Figura 25
Σ dei PCDD/PCDF negli strati profondi del terreno inglese



Greene et al., Environ Technol 35, 1974-1981, 2001

Figura 26
Distribuzione di PCB, DDT, Mirex e HCB nei sedimenti del lago Ontario (Canada)



Lebeuf e Nunes, Environ Sci Technol 39, 1470-1478, 2005

Le sorgenti più importanti di PCDD sono l'industria chimica e gli inceneritori, in particolare quelli di rifiuti ospedalieri (date le cattive condizioni di esercizio degli impianti e l'alto contenuto in cloro dei rifiuti, plastiche clorate di largo uso per materiali "usa e getta") (figura 27). Come si può vedere tutti gli inceneritori emettono PCDD e PCDF, in quantità variabile in funzione del tipo di materiale bruciato, delle temperature di esercizio e dei meccanismi di filtraggio dei fumi utilizzati. Secondo i produttori (fatto da confermare) i nuovi inceneritori ben gestiti producono assai modeste quantità di PCDD e PCDF.

Come altri inquinanti anche i PCDD e PCDF vengono trasportati a grande distanza. La figura 28 dimostra un esempio di diffusione a distanza dell'inquinamento da PCDD calcolato per gli Stati Uniti. Come si può vedere il trasporto avviene secondo la direzione dei venti dominanti (nord-est) ed anche in zone geografiche a migliaia di km di distanza. Questo gruppo di inquinanti è caratterizzato da una lunga permanenza nell'ambiente, perché esistono pochi enzimi batterici e di cellule eucariote che catalizzano la dechlorazione di questi composti organoclorurati.

L'intossicazione acuta da PCDD fu per la prima volta segnalata in USA tra i lavoratori chimici e in Svezia tra i boscaioli, in seguito, in seguito fu descritta una intossicazione di cavalli da corsa nel Missouri (USA) (figura 29). Successivamente furono segnalati casi di intossicazione occupazionale e su veterani dell'esercito americano esposti ad erbicidi (il 2,4-D o acido 2,4-diclorofenossiacetico ed al 2,4-T o acido 2,4,5-

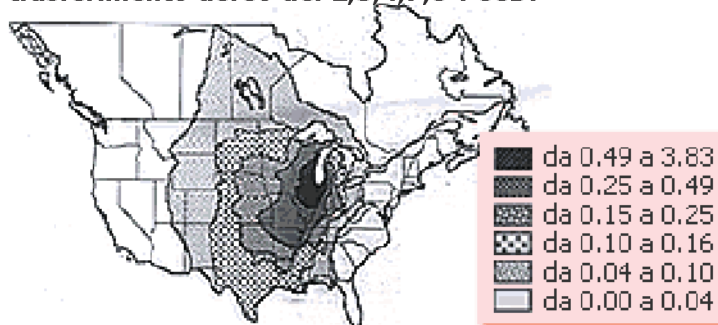
Figura 27

Emissione di PCDD e di PCDF da inceneritori municipali (ng/nm³)

Belgio	PCDD	PCDF
Impianto I	3900	4600
Impianto II	840	2900
Canada	PCDD	PCDF
Hamilton, ON	1100-7200	3000-10300
Prince Edward Island	60-190	100-210
Impianto pilota di controllo	1	2
Germania	PCDD	PCDF
Impianto vecchio	130-610	300-2400
Olanda	PCDD	PCDF
Media di 9 impianti	1500	1300
Svezia	PCDD	PCDF
Valore più basso	120	140
Valore più alto	1300	1700
USA	PCDD	PCDF
Hampton, VA	500-3800	1600-16000
NY	15-30	50-80

Figura 28

Distribuzione percentuale geografica del trasferimento aereo del 2,3,4,7,8-PeCDF



Commoner et al., comunicazione personale

Figura 29

Intossicazioni da PCB e TCDD

- Industrie chimiche (cloracne, USA)
- contaminazione dello sbilizzante del legno pentaclorofenolo (boscaioli, Svezia)
- Intossicazione accidentale dei cavalli da corsa per uso di diserbanti contaminati sulla pista (Missouri, USA)

triclorofenossiacetico, usati nella guerra aerea contro i vietcong (**figura 30**). Gli effetti di queste contaminazioni sono schematizzati nella **figura 31**. Un caso clamoroso di cloracne (acne patologica da clorurati) è quello del premier ucraino Yushenko (**figura 32**), avvelenato dai suoi oppositori nel 2004. I livelli di PCDD nei lipidi di questo politico (analizzati in un centro di ricerca viennese) sono risultati 1000 volte più alti della popolazione generale. Chiunque lo abbia avvelenato voleva ammazzarlo (non solo renderlo non telegenico), ma ha sbagliato dose.

I dati relativi a Seveso, dove in un weekend circa 2 kg di TCDD furono liberati nell'atmosfera da un reattore dell'ICMESA (1976) hanno permesso di seguire negli anni una popolazione esposta ad alte dosi di TCDD (zona A), una a dosi minori (zona B), riferite ad una di controllo (la Lombardia) (**figura 33**). Gli effetti acuti furono una immediata moria di animali domestici e la comparsa di cloracne nei bambini (**figura 34**).

Figura 30
Uso dei diserbanti 2,4,5-T e 2-4-D* contaminati da PCDD e PCDF nella guerra del Vietnam

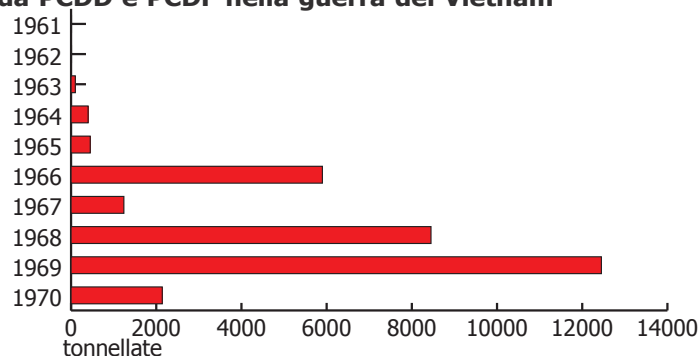


Figura 31
Effetti legati all'esposizione agli erbicidi contaminati con PCDD*

- Sarcomi dei tessuti molli
- Linfoma non-Hodgkin's
- Morbo di Hodgkin's
- Cloracne
- Porfiria

Possibile associazione anche con:

- Tumori respiratori
- Cancro della prostata
- Mieloma multiplo

* Da studi condotti in USA su soggetti con esposizione occupazionale sui veterani del Vietnam

Veterans and Agent Orange, National Academy Press, USA 1994

Figura 32
Gli effetti cutanei della diossina: cloracne



Un diabolico avvelenamento ha deformato il volto di Yushchenko

Figura 33
Aree intorno all'impianto dell'ICMESA di Seveso, interessata alla contaminazione da diossina

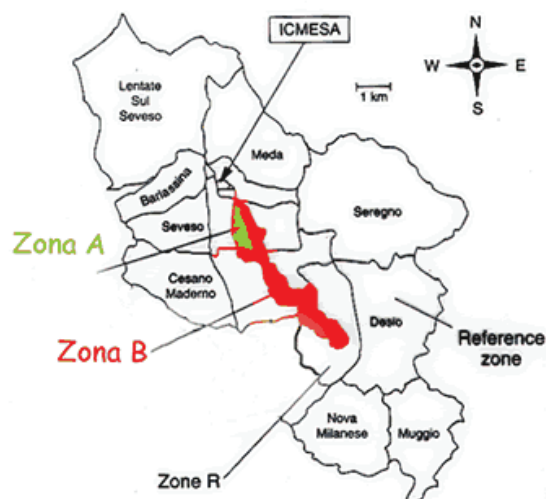
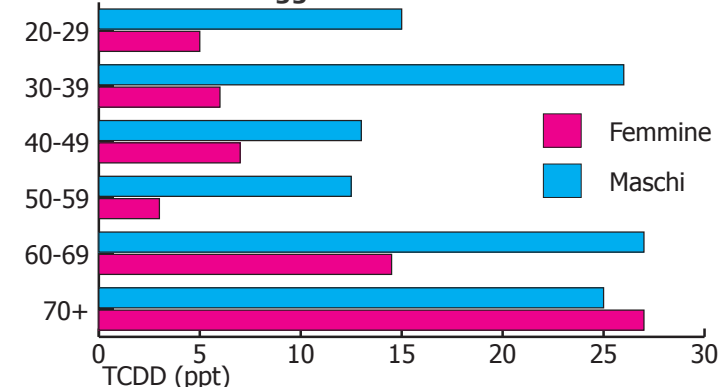


Figura 34**Gli effetti cutanei della diossina: cloracne****Figura 35****Livelli di TCDD in soggetti residenti a Seveso**

Baccarelli et al., British J Dermatol 152, 459-465, 2005

Figura 36**Incidenza di vari tipi di cancro nell'aria di Seveso, a 20 anni dalla contaminazione da diossina**

Zona A (11.560 py)	RR	95%CL
tumori tratto digestivo	1.5	0.5-3.5
Zona B (83.610 py)		
Tumori tratto digestivo (F)	2.4	0.8-5.7
Tumori renali (M)	6.2	1.7-15.9
Leucemie (M)	3.1	1.3-6.4
Morbo di Hodgkin (M e F)	3.3	0.9-11

Pesatori et al., Ind Health 41, 127-138, 2003

Figura 37**Incidenza di varie forme di cancro in 5132 lavoratori del settore chimico esposti a TCDD**

	SMR	95% CL
Incidenza totale di tumori	1.13	1.02-1.25
Nei lavoratori più esposti	1.6	1.15-1.82

Steenland et al., J Natl Cancer Inst 91, 779-786, 1999

Figura 38**Effetto dei PCB in lavoratori esposti**

- Cloracne
- Disturbi epatici
- Alterazione della funzione respiratoria
- Diminuzione del peso alla nascita in bambini di donne esposte
- Irritazione oculare
- Tumori???
- Nessun aumento della mortalità

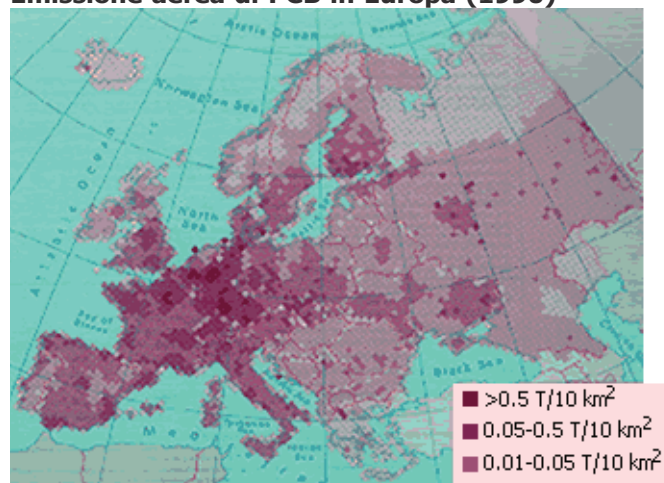
Lo studio epidemiologico a distanza, coordinato dal Prof. Pier Alberto Bertazzi dell'Università di Milano, dopo un periodo di 30 anni, ha dimostrato la persistenza di un eccesso di TCDD a nel sangue (figura 35). Gli aumenti di tumori più significativi sono a carico del rene e del sangue (leucemie) (figura 36).

Le conseguenze dell'esposizione alle diossine sulla frequenza di tumori sono state studiate anche in altre popolazioni, come i lavoratori dell'industria chimica americana, nei quali si è osservato un modesto aumento del numero complessivo di tumori (figura 37). Negli esposti al PCB i fenomeni maggiori si sono osservati a livello respiratorio e cutaneo (figura 38).

Non è certo se, e in che misura, i PCDD e PCDB siano in grado di esplicare effetti tossici, riproduttivi, teratogeni a basse concentrazioni (prevalenti nelle normali condizioni di esposizione ambientale). Le opinioni al riguardo sono diverse anche nella comunità scientifica.

La contaminazione da PCB in Europa è sicuramente elevata (**figura 39**). Attraverso l'amplificazione legata alla catena alimentare livelli dosabili di queste sostanze possono esser misurati in alcuni alimenti come la carne (**figura 40**).

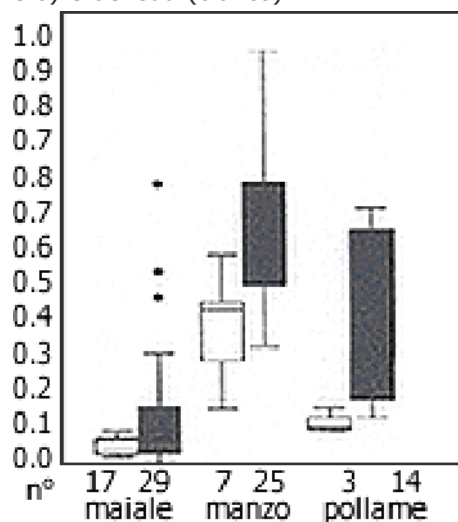
Figura 39
Emissione aerea di PCB in Europa (1990)



Europe's environment: the second assessment, Elsevier, 1998

Figura 40
Equivalenti tossici di TCDD nella carne tedesca (sopra) e assunzione giornaliera di PCDD e PCDD da vari componenti della dieta (sotto)

Equivalenti tossici (TEQ) di TCDD nella carne del nord (nero) e del sud (bianco)



Contributo di diversi alimenti alla assunzione di TCDD in Germania (1977)

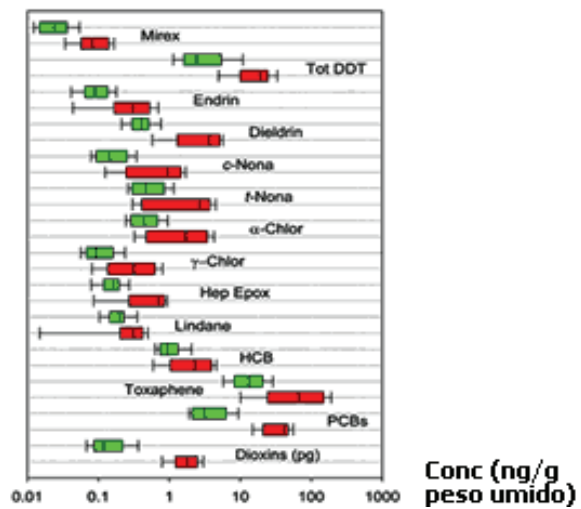


Mayer et al., Chemosphere 43, 857-860, 2001

Uno studio recente (**figura 41**) ci ricorda che i policlorurati possono essere presenti ad alte concentrazioni nel pesce (salmone). Le concentrazioni sono abbastanza basse nel pesce "pescato", ma sono elevate nel pesce d'allevamento in ogni parte del mondo (**figura 42**). Sulla base di queste analisi, considerati i livelli dichiarati sicuri dalla EPA americana, non sarebbe consigliabile consumare salmone di allevamento più di una volta al mese (**figura 43**).

Figura 41

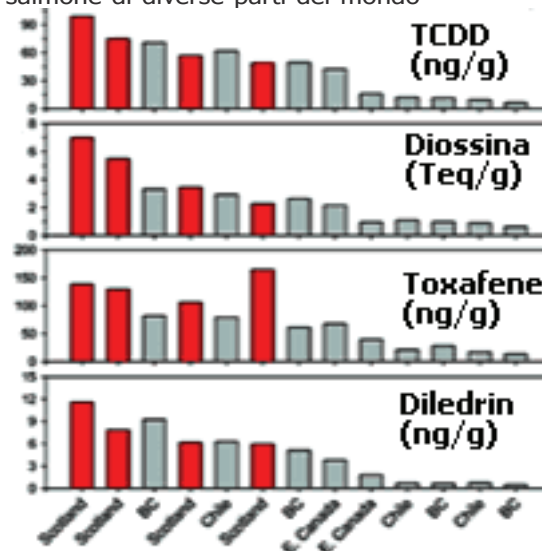
Un caso recente. Concentrazioni di organoclorurati (ng/g peso umido) nel salmone pescato (verde) e allevato (rosso)



Hites et al., Science 303, 144-155, 2004

Figura 42

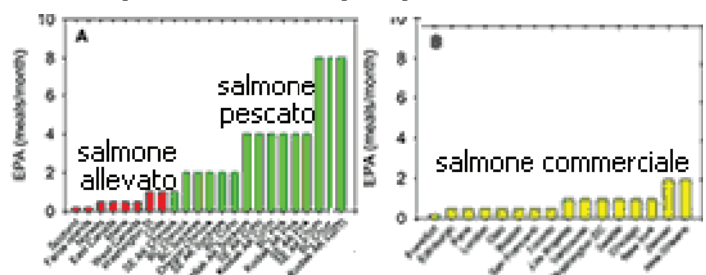
Concentrazione di organoclorurati (PCB, ng/g; diossine pgTEQ/g; toxafene ng/g; dieldrin ng/g peso umido) nel salmone di diverse parti del mondo



Idem

Figura 43

Numero di pasti di salmone consigliati al mese (in ordinata) secondo l'EPA (USA)



Idem

rox

lezione n. 21

Estrogeni ambientali

Gli "estrogeni ambientali" rappresentano un gruppo di inquinanti a bassa attività estrogenica che hanno la capacità di interferire con le funzioni estrogeno-correlate degli organismi viventi. Sono anche chiamati EDC o Endocrine Disrupting Chemicals.

Gli estrogeni sono potenti regolatori della sintesi di proteine che controllano importanti funzioni cellulari (come il differenziamento), con un meccanismo di azione da tempo noto (**figura 1**), che presuppone l'interazione con un regolatore citoplasmatico, il quale trasferendosi a livello del nucleo delle cellule, attiva selettivamente alcuni geni. Possono quindi considerarsi possibili bersagli degli EDC tutti quei tessuti o organi in cui sono presenti recettori specifici per gli estrogeni.

Tra i primi EDC descritti ci sono alcuni farmaci che nel corso della terapia hanno mostrato effetti estrogenici accanto agli effetti farmacologici. Tra questi il chetoconazolo (fungicida) (**figura 2**) la cimetidina (anti-ulcera), e la finasteride usata contro l'ipertrofia prostatica (**figura 3**). Altri contaminanti estrogeno-simili sono il DDT, i PCB, il toxafene, il metoxiclor e l'endosulfan (**figura 4**) ed un pesticida antifungino di comune uso, il vinclozolin (**figura 5**).

Gli effetti indesiderati degli EDC finora osservati sono la compromissione della capacità riproduttiva nei maschi, con possibile sterilità (**figura 6**); forse gli estrogeni ambientali sono responsabili della riduzione delle conte spermatiche osservate nel XX secolo (**figura 7**) e dell'aumento di tumori testicolari. Infatti l'oligospermia è associata ad un aumento di rischio di

Figura 1

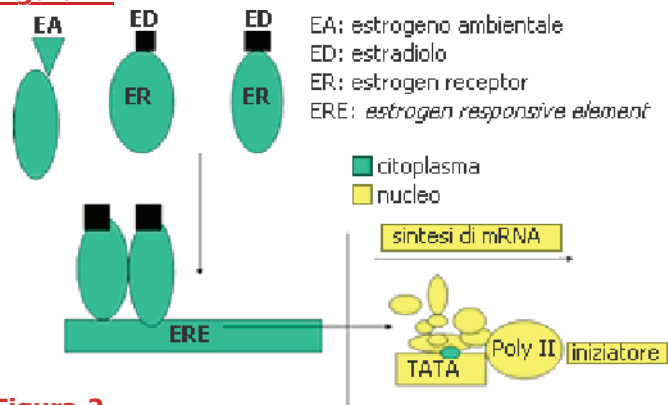


Figura 2

Farmaci con effetti collaterali ormono-simili: **chetoconazolo (fungicida)**

Meccanismo	Sito di azione	Effetti
spiazzamento degli estrogeni	proteine plasmatiche	ginecomastia

Figura 3

Farmaci con effetti collaterali ormono-simili: **finasteride**

Meccanismo	Sito di azione	Uso clinico
inibizione della 5-alfa-reduttasi	prostata	ipertrofia prostatica, caduta dei capelli?

Figura 4

Xenobiotici con effetti estrogeno-simili: **DDT, alchilfenoli, PCB, toxafene, dieldrin, metoxyxlor, endosulphan**

Meccanismo	Sito di azione	Effetti
agonisti con bassa affinità dei recettori ormonali	gonadi, organi sessuali e mammella	alterazioni dello sviluppo sessuale, tumori?

Figura 5

Xenobiotici con effetti ormono-antagonisti: **vinclozolin (antifungino)**

Meccanismo	Sito di azione
antagonisti dei recettori androgenici	tessuti androgeno-dipendenti

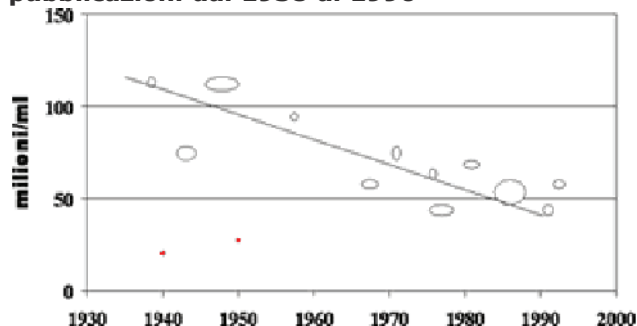
Figura 6

Effetti delle sostanze estrogeniche sul maschio

- La somministrazione degli estrogeni nei maschi adulti riduce la conta degli spermii
- gli estrogeni somministrati in fase perinatale compromettono la fertilità da adulti

Figura 7

Densità spermatica media umana riportata in 63 pubblicazioni dal 1938 al 1990



cancro testicolare (**figura 8**) e quasi tutti i soggetti con cancro testicolare hanno anomalie spermatiche (**figura 9**).

Nelle femmine gli EDC sono considerati una possibile causa del menarca precoce (**figura 10**). Tuttavia è possibile che questo sia anche legato ad un eccesso di nutrizione. Infatti nella "grande carestia" olandese nel corso della seconda guerra mondiale, si ebbe uno slittamento di qualche anno dell'età del menarca nelle zone occupate dai tedeschi (**figura 11**).

Il problema degli EDC è stato considerato così importante da giustificare la pubblicazione di un fascicolo in una importante rivista tossicologica; le società di tossicologia dell'Europa del Nord hanno creato una speciale sezione dedicata a questi problemi (**figura 12**). In base a quanto affermato in questa pubblicazione, le sorgenti più importanti di esposizione agli EDC sono l'acqua e gli alimenti. Tra le sostanze sospettate di un effetto estrogenico ambientale ci sono i fitoestrogeni, alcuni contaminanti industriali e i plastificanti (**figura 13**). Tra i contaminanti clorurati, i PCB causano femminizzazione nelle tartarughe (**figura 14**), il DDT nelle tartarughe, nelle rane e negli uccelli (**figura 15**), il PCB e le diossine policlorurate riducono la fertilità degli ermellini e dei gabbiani (**figura 16**). Gli estrogeni ambientali alterano la fertilità dei pesci (**figura 17**), dei rettili acquatici (**figura 18**) ed anche degli invertebrati (**figura 19**).

Figura 8

Legame tra sterilità maschile e tumori testicolari

Gli individui con cancro testicolare hanno una riduzione del 6% della conta spermatica ogni anno

Figura 9

Tutti i soggetti con cancro testicolare presentano anomalie della funzione spermatica

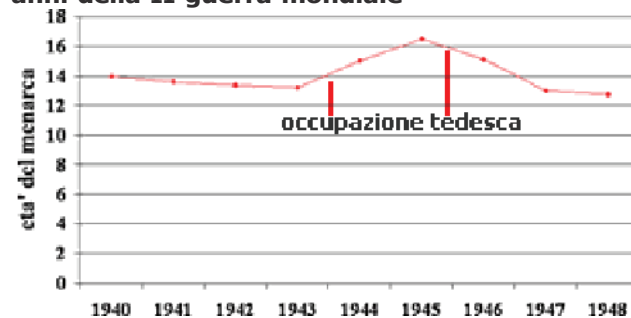
Figura 10

Effetti degli estrogeni ambientali sulle femmine

- gli estrogeni ambientali possono causare menarca precoce
- il menarca precoce riduce la statura ed è un fattore di rischio per i tumori mammari

Figura 11

Variazioni dell'età del menarca in Olanda negli anni della II guerra mondiale



Rudolf Kaacs, comunicazione personale

Figura 12

Un problema emergente: gli estrogeni ambientali



Figura 13

Sorgenti dell'aumento della esposizione agli estrogeni negli ultimi 50 anni

- anticoncezionali nell'acqua trattamenti degli animali da carne con ormoni
- contaminanti chimici con effetti estrogenici
- fitoestrogeni (aggiunti nei cibi industriali)

Figura 14

Contaminanti con effetti estrogenici: effetti ambientali

- PCB: alterazione del rapporto tra i sessi nelle tartarughe
- alterato metabolismo degli steroidi nei ratti
- alchilfenoli e ftalati: effetti estrogenici nei ratti

Figura 15

- o,p-DDT: femminizzazione di tartarughe, uccelli e rane
- endosulfan, toxafene, dieldrin, bisfenolo-A: iperproliferazione in cellule mammarie umane

Figura 16

Effetti sull'ambiente degli EDC*

- riduzione della fertilità nei gabbiani (DDT)
- riduzione delle popolazioni di ermellini (PCB e PCDD)

* *Van der Kraak, Environ Health Perspect 114, 1276-1282, 2006*

Figura 17**Effetti degli estrogeni ambientali**

- Alterata funzione testicolare nei pesci, deformazioni, alta mortalità (effluenti fognari)
- Riduzione delle dimensioni del pene e abnorme sviluppo testicolare negli alligatori (delta del Mississippi)

Figura 18

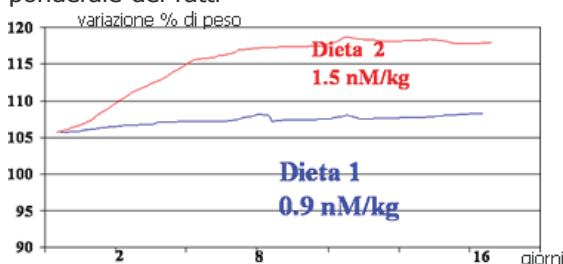
- p-DDE: demascolinizzante negli alligatori
- vinclozolin: produce metaboliti antiandrogenici in vivo nel ratto

Figura 19

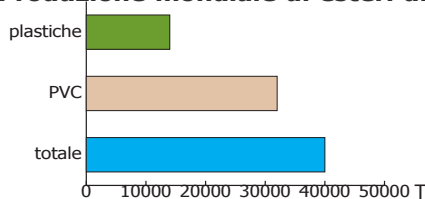
Effetti di alcuni contaminanti metallici: pseudoermafroditismo negli invertebrati (tributiltin, derivato organico dello stagno usato come biocida in vernici e per il trattamento del legno)

Figura 20

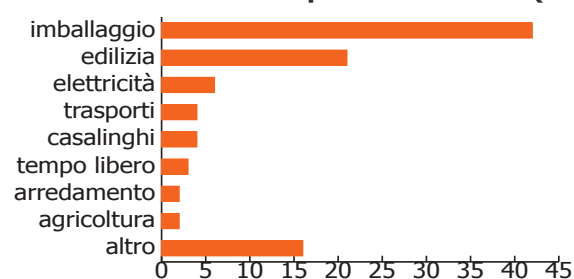
Effetto di diete a diverso tenore di estrone sulla crescita ponderale dei ratti



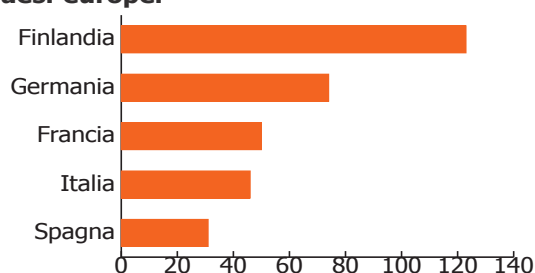
Ramesar et al., J Nutr 38, 247-253, 1999

Figura 21**Produzione mondiale di esteri di acidi ftalici**

Rielaborato da dati contenuti in http://www.tecnoco.uk/gen/z_sys_Products.aspx?productid=33

Figura 22**Settori di utilizzo delle plastica in Italia (%)**

Rielaborato da dati contenuti in http://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/impacts/article_3021_en.html

Figura 23**Uso della plastica (kg/capite/anno) in alcuni paesi europei**

Idem

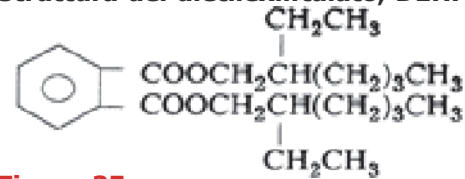
Gli effetti degli estrogeni ambientali si aggiungono a quelli degli estrogeni naturali, presenti nella carne o aggiunti alla dieta di animali da allevamento. Gli estrogeni naturali come l'estrone sono presenti in diversi alimenti, e possono causare nei ratti da esperimento un abnorme accrescimento ponderale (figura 20). Negli alimenti sono anche presenti fitoestrogeni naturali, in particolare nei fagioli e nella soia, i cui effetti sono ancora mal caratterizzati.

Sostanze particolarmente tossiche per l'apparato riproduttore maschile sono gli ftalati, prodotti in tutto il mondo (figura 21) e contaminanti delle plastiche (figura 22); gli ftalati che sono quantitativamente uno dei principali prodotti industriali moderni (figura 23). Particolarmente tossico sull'apparato riproduttivo è il dietileilftalato (DEHP), componente importante di alcune plastiche, utilizzato anche nell'industria dell'abbigliamento per trattare e rendere anti-grinza le stoffe (figura 24).

Gli ftalati provocano degenerazione testicolare (figura 25). Il DEHP si bioconcentra nelle piante (figura 26) e negli insetti e nelle lumache (figura 27). Gli ftalati sono deboli agonisti dei recettori estrogenici, a cui si legano in concentrazione 100-1000 volte più alta rispetto agli agonisti fisiologici (estradiolo) (figura 28). Anche alcuni pesticidi clorurati, come l'endosulfan ed il dieldrin, sono in grado di spiazzare l'estradiolo dai suoi recettori, legandosi ad essi con bassa affinità (figura 29).

Figura 24

Struttura del dietilexilftalato, DEHP

**Figura 25**

Effetti degli ftalati

- degenerazione testicolare
- riduzione dei livelli di testosterone
- sterilità
- degenerazione testicolare
- riduzione dei livelli di testosterone
- sterilità

Figura 26

DEHP, fattore di bioconcentrazione (rapporto concentrazione negli organismi viventi/acqua)

- erbe palustri (*Elodea canadensis*) 275

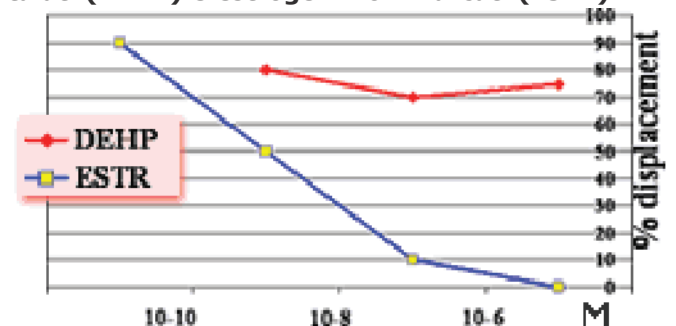
Figura 27

DEHP, fattore di bioconcentrazione (rapporto concentrazione negli organismi viventi/acqua)

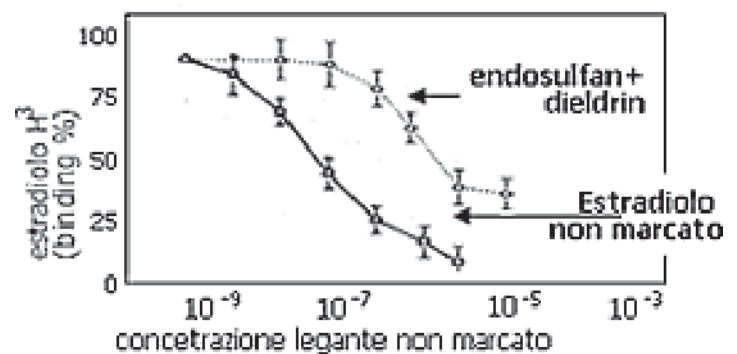
- zanzara (*Culex pipiens*) 1320
- gambero (*Penaeus atzecus*) 11
- lumache (*Physa*) 857

Figura 28

Spiazzamento (diplacement) di estrogeni marcati (^3H -estradiolo) dai recettori degli estrogeni con ftalati (DEHP) e estrogeni non marcati (ESTR)

**Figura 29**

Inibizione del binding di ^3H -estradiolo al recettore agli estrogeni con pesticidi clorurati



Arnold et al., Science 272, 1469-1473, 1996

Tra gli EDC sono importanti anche gli alchilfenoli, composti ad alta produzione industriale (**figura 30**), che si bioaccumulano. Le sorgenti di esposizione sono le plastiche, il pesce e l'acqua, ma l'esposizione umana è modesta (**figura 31**). Anche l'attività estrogenica del 4-nonilfenolo (4-NF) è bassa (**figura 32**); secondo alcuni autori, le concentrazioni effettive cellulari di 4-NP sono troppo basse e troppo inferiori al NOAEL per aver effetti (**figura 33**).

Un caso particolare di tossicità degli EDC, scoperto di recente grazie ad un tossicologo americano (Hayes), è quello dell'atrazina e consimili (**figura 34**), sostanze con tossicità acuta modesta, ampiamente usate come diserbanti (**figura 35**). Applicata da sola o con i suoi derivati (acetilatrazina), in particolare per la coltura del mais e del riso, è stata bandita in diversi stati europei, tra cui l'Italia.

Si è scoperto più tardi che l'atrazina induce l'aromatasi (**figura 36**). Infatti provoca alterazioni della fertilità negli agricoltori che la usano (**figura 37**). Nei paesi dove non è stata bandita, come gli USA, la quantità usata per ettaro è molto alta (**figura 38**), anche se le concentrazioni ambientali non devono superare per legge i 3 ppb.

Figura 30

Gli alchilfenoli (4-nonilfenolo,4-NP)

- stabilizzanti e antiossidanti (presenti in cosmetici, pesticidi, plastica, gomma, vernici)
- uso annuale (Europa): 80000 tonnellate
- derivano dalla degradazione microbica degli alchilfenoli polietossilati
- gli alchilfenoli sono persistenti e si bioaccumulano

Figura 31

Stima della esposizione umana al 4-NP

- migrazione dalla plastica 0.1 mg/d
- consumo di pesce 0.002-0.003 mg/d
- acqua alimentare 0.006 mg/d
- stima dell'assunzione totale umana ≤ 0.16 mg/d

Figura 32

Potenza relativa del 4-NP rispetto al 17 β -estradiolo

- trota 0.0007
- MCF-7 (cellula tumorale mammaria umana) 0.0003

Figura 33

Effetti umani del 4-NP

- il rapporto fra NOAEL ed esposizione umana al NP ha un fattore di sicurezza di 5000
- il rapporto di concentrazione cellulare rispetto alla concentrazione minima con effetti estrogenici ha una fattore di sicurezza di 4000

Müller et al., Arch Toxicol 71, 112-122, 1996

Figura 34

Estrogeni ambientali: atrazina

Erbicida sistemico del gruppo delle triazine

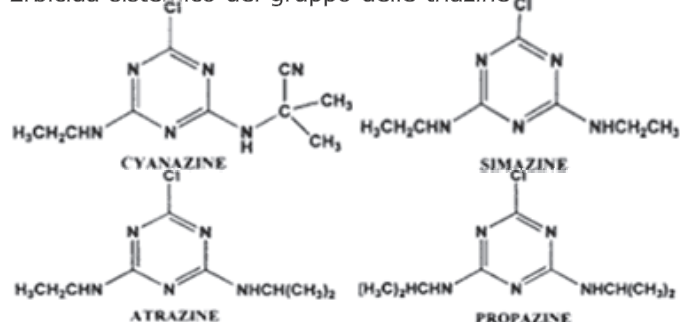


Figura 35

Atrazina

- introdotta nel 1958
- uno dei più venduti prodotti della Novartis e della Aventis (400x10⁹ \$/anno)
- interferisce con la fotosintesi delle piante infestanti e si assorbe attraverso le radici (erbicida sistemico)

Figura 36

Estrogeni ambientali: atrazina

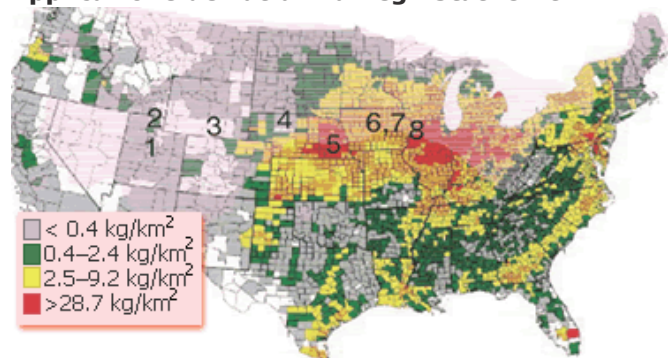
- LD50 per il ratto 1.8-3 g/kg
- non teratogena né mutagena
- cancerogenicità controversa
- induce l'aromatasi, l'enzima che trasforma gli androgeni in estrogeni

Figura 37

L'atrazina

- riduce la fertilità degli agricoltori
- la concentrazione massima ammessa (EPA, USA) è di 3 ppb

Figura 38
Applicazione dell'atrazina negli Stati Uniti



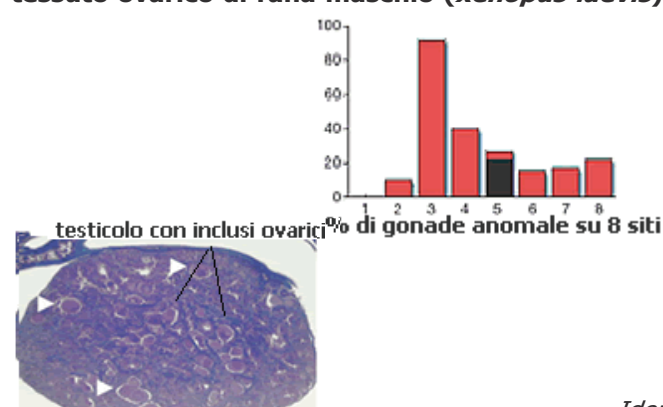
Hayes et al., *Nature* 419, 895-896, 2002

Hayes ha dimostrato che l'atrazina alle concentrazioni presenti nell'ambiente altera le gonadi maschili delle rane (*Rana pipiens*), provocando inclusi ovarici nei testicoli (**figura 39**); sempre nelle rane riduce il livello di testosterone ematico (**figura 40**) e modifica la laringe dei maschi, riducendone la dimensione, che cresce nei maschi e non nelle femmine durante la maturazione sessuale (**figura 41**).

Nonostante sia bandita da anni in Europa, è sempre dosabile nell'acqua delle zone dove viene usata in agricoltura (**figura 42**).

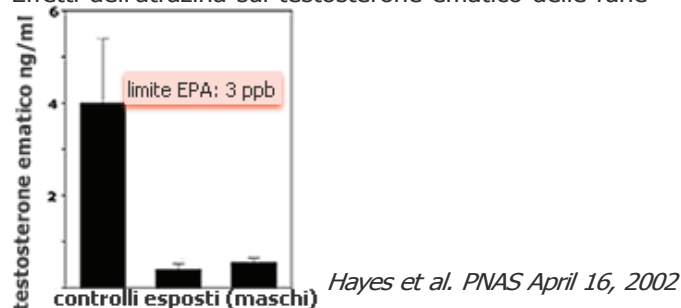
In conclusione, nonostante le molte informazioni pubblicate sull'effetto degli EDC su organismi diversi (rane, coccodrilli, orsi polari), non è ancora noto quali siano gli effetti a lungo termine di queste sostanze e quali siano gli effetti su popolazioni umane.

Figura 39
Effetti dell'atrazina (0.1 ppb) sulle inclusioni di tessuto ovarico di rana maschio (*xenopus laevis*)



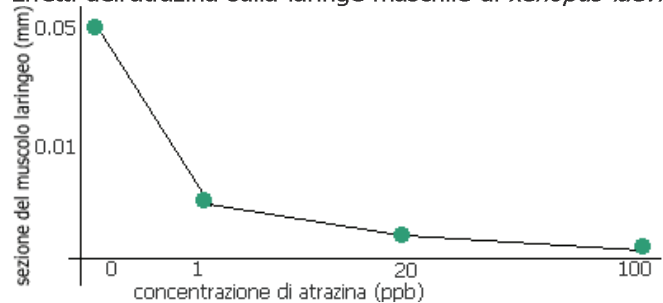
Idem

Figura 40
Effetti dell'atrazina sul testosterone ematico delle rane



Hayes et al. *PNAS* April 16, 2002

Figura 41
Effetti dell'atrazina sulla laringe maschile di *xenopus laevis*



Hayes et al., *PNAS* April 16, 2002

Figura 42
Situazione dell'atrazina e degli erbicidi triazinici

- l'atrazina è stata bandita in diversi stati europei, tra cui l'Italia, negli anni '90
- l'atrazina ed i suoi derivati sono ancora presenti a concentrazioni efficaci sull'apparato riproduttivo nell'acqua delle zone agricole (Belgio e Italia, 2002)

rox

lezione n. 22

Idrocarburi policiclici aromatici

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) o PAH (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) (**figura 1**) sono composti organici contenenti due o più anelli benzenici condensati, alcuni dei quali con un anello pentatomico (a volte con azoto (7H-DC)). Questi composti sono considerati tra i "priority pollutants", o inquinanti prioritari dal punto di vista della contaminazione ambientale dalla EPA (Environmental Protection Agency, USA).

Gli IPA si formano durante la combustione incompleta di materiali organici che generano frammenti idrocarburi che interagendo danno origine a complesse strutture policicliche. La presenza degli IPA nell'ambiente deriva da varie forme di combustione incompleta o da fenomeni di origine naturale (eruzioni vulcaniche e incendi) e da attività antropiche (industrie, veicoli) (**figura 2**). Nelle zone ad alto rischio di incendio boschivo o, in agricolture primitive, dove si usa il fuoco per creare zone adatte alla coltivazione (Amazzonia e Sud-est asiatico), questo può contribuire all'aumento dei livelli degli IPA nell'ambiente. Una sorgente importante degli IPA nelle città è il traffico automobilistico, particolarmente nei mesi autunnali e invernali il riscaldamento con gasolio, nafta e carbone.

Gli effetti tossici degli IPA sono noti da almeno due secoli (**figura 3**), ma la dimostrazione dell'azione cancerogena di IPA chimicamente caratterizzati risale solo a pochi decenni fa (**figura 4**).

Figura 1
Formule dei principali idrocarburi policiclici aromatici

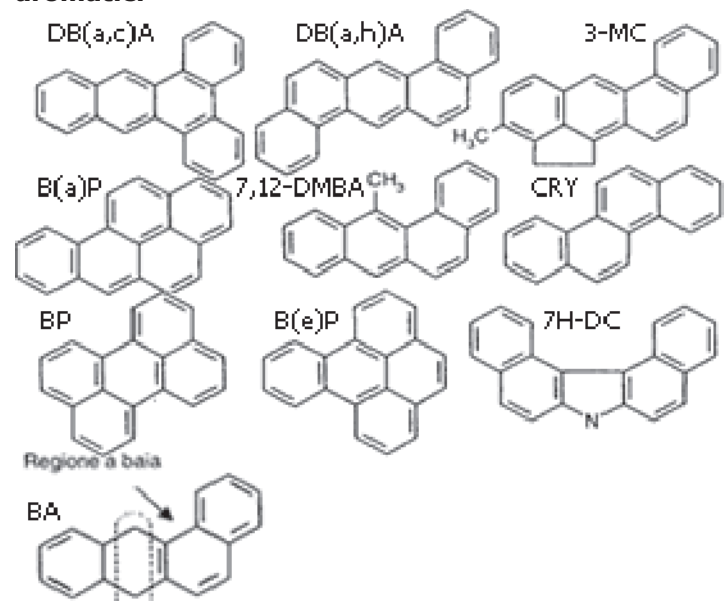


Figura 2
Formazione degli IPA:

- combustioni naturali (eruzioni vulcaniche, incendi)
- combustione di prodotti fossili (carbone, gasolio, benzina)
- combustione di prodotti organici (legno)
- fumi di scarico dei motori a scoppio

Figura 3
Esposizione agli IPA, cenni storici:

- 1775 Percival Pott (UK) descrive il cancro dello scroto negli spazzacamini e ipotizza la responsabilità della fuliggine
- Circa 100 anni dopo in Germania, si osserva un'alta incidenza di tumori cutanei in lavoratori esposti a catrame
- Nel 1915 Ymagawa e Ichikawa descrivono l'insorgenza di tumori cutanei in topi spennellati con catrame

Figura 4

- Nei primi anni '30 sono isolati dal catrame diversi idrocarburi policiclici aromatici
- Nel 1930 viene sintetizzato il primo IPA (dibenzoanthracene, DBA), cancerogeno

I dati sul metabolismo degli IPA derivano principalmente da esperimenti su roditori (topo, cavia, ratto, criceto). Gli IPA fanno parte di quei cancerogeni chimici che richiedono "attivazione metabolica" per passare da pre-cancerogeni a cancerogeni, con la formazione di derivati ossidati.

Nel caso del benzo(a)pirene (B(a)P), il composto ossidato più reattivo è il B(a)P 7,8-diolo 9,10-epossido (figura 5). Ma esiste anche una via di attivazione diretta mediata da una perossidasi (figura 6). I composti reattivi originati dal B(a)P reagiscono con le basi del DNA e formano voluminosi addotti (figura 7). La maggior parte di questi addotti si formano con l'azoto 2 della guanina (figura 8).

Figura 5
Metabolismo del benzopirene (IPA-PAH)

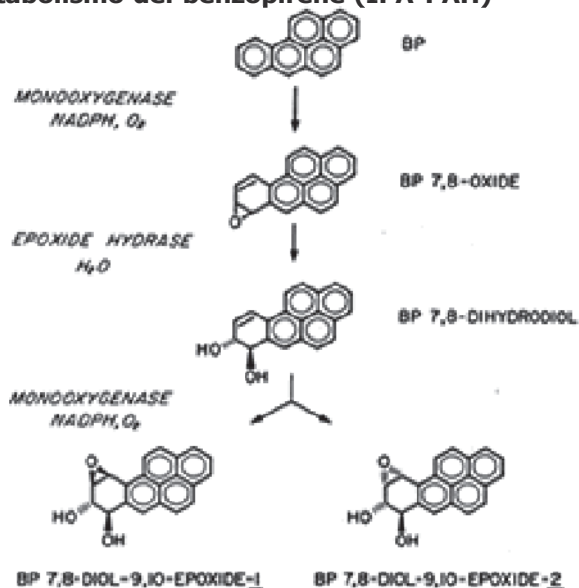


Figura 6

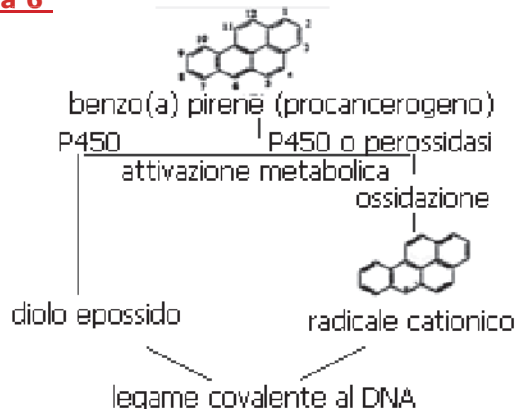
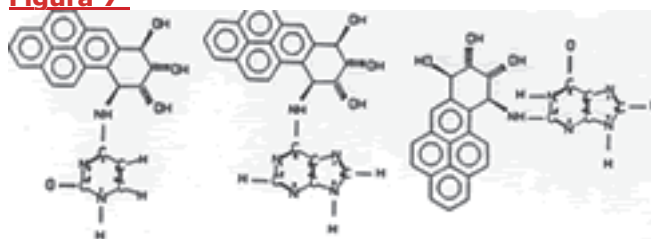


Figura 7



Addotti del benzo(b)pirene con le basi puriniche e pirimidiniche attraverso la formazione di un epossido

	BP-6-C8Gua	BP-6-N7Gua	BP-6-N7Ade
Microsomi	12%	10%	58%
Pelle di topo	34%	10%	30%

Addotti del Benzo(a)pirene con le basi puriniche e pirimidiniche attraverso la formazione di un catione radicalico

Figura 8

Addotti al DNA del B(a)P-7, 8-DIOL-9, 10-EPOSSIDO

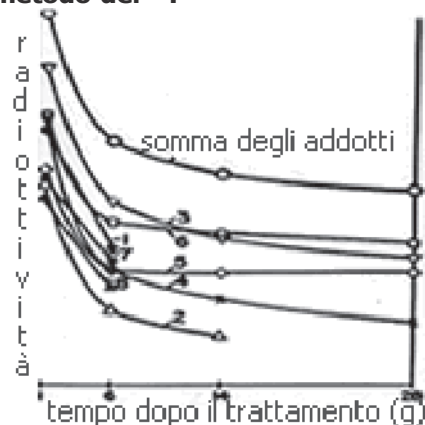
- N2 GUANINA 90%
- N6 ADENINA 5%
- N4 CITOSINA 1%
- NON IDENTIFICATI 4%

Gli addotti possono venire rimossi, ma la loro persistenza è dell'ordine di diverse settimane (figura 9). Presumibilmente anche altri effetti biologici degli IPA, come i fenomeni lesivi di natura aterosclerotica e la soppressione della risposta immunitaria, hanno necessità di attivazione metabolica. Gli IPA sono attivati dal CYP450 1a1; questo citocromo, insieme al CYP2, CYP3, CYP4 viene indotto dagli IPA. L'induzione è diversa nei diversi organi e nei diversi soggetti (figura 10). Il fenotipo di un soggetto può così modulare l'espressione degli enzimi metabolizzanti a livello del fegato, polmone e rene; questo può concorrere a spiegare la diversa suscettibilità individuale agli IPA.

Gli IPA (figura 11) interagiscono con un sistema recettoriale detto "locus Ah" (da Ah: Aromatic hydrocarbon). Dall'interazione con questo recettore citosolico lo xenobiotico viene trasportato nel nucleo, dove attiva la trascrizione ed aumenta la concentrazione di mRNA per i P450.

L'attacco metabolico degli IPA da parte degli enzimi microsomiali epatici porta ad epossidi intermedi, diidrodiooli, fenoli, e ad una combinazione di questi. I metaboliti possono successivamente essere coniugati con acido glucuronico, con glutazione o con acido solforico e formare così composti più polari e quindi facilmente eliminabili. Gli IPA sono altamente liposolubili e vengono assorbiti attraverso polmoni, intestino e pelle. La via principale di assorbimento è la via orale e inalatoria.

Figura 9
Decadimento degli addotti del B(a)P al DNA con il metodo del ^{32}P



Randerath et al., IARC, pub 59, 217-231, 1984

Figura 10

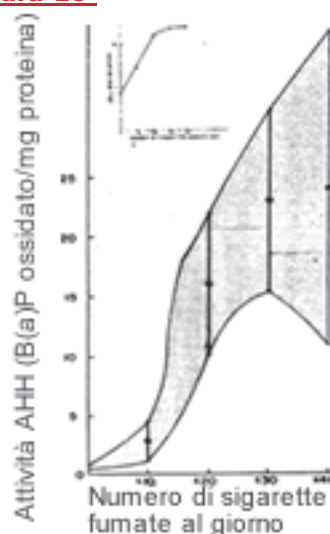
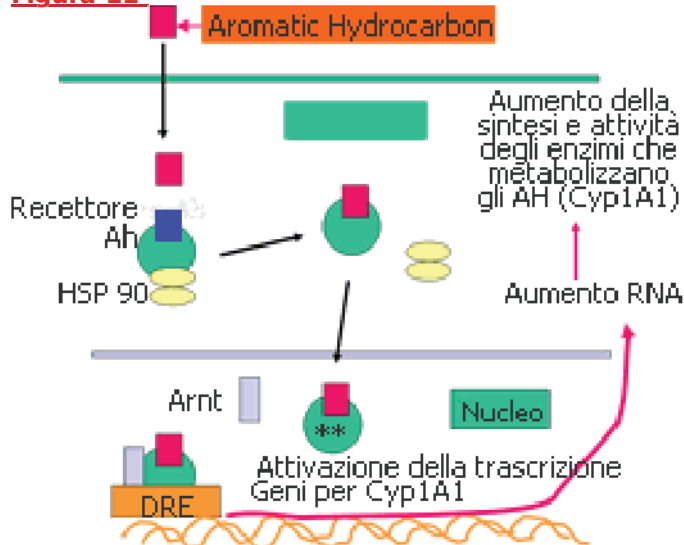


Figura 11



Gli IPA sono potenti cancerogeni, e producono tumori nei mammiferi se somministrati per via percutanea, alimentare, inalatoria e intramuscolare (quest'ultima non corrisponde alla esposizione naturale). I tumori più frequenti sono a livello cutaneo, polmonare, epatico, mammario (B(a)P B(a)A e B(b)F), linfatico, cutaneo e polmonare (B(j)F, B(k)F e Cry) (**figura 12**).

L'attività dei diversi composti varia; l'IPA più attivo in senso mutageno e cancerogeno è il B(a)P, seguito dal benzoantracene (BA) (**figura 13**). Questa variazione di attività deve esser considerata, come nel caso delle diossine, per calcolare l'attività di miscele ambientali di PAH. Il crisene è mutageno, ma molto debolmente cancerogeno.

La produzione di B(a)P è legata principalmente alla combustione di rifiuti, a processi industriali ed al riscaldamento (**figura 14**). Gli autoveicoli sono importanti non per le quantità assolute prodotte, ma perché nelle città sono la principale sorgente di IPA. Le concentrazioni più elevate di IPA si misurano nelle emissioni degli inceneritori, degli impianti industriali e delle combustioni non controllate (ad esempio per combustioni spontanee o incontrollate nelle discariche di rifiuti) (**figura 15**).

Figura 12

IPA	vie di somministrazione				organi bersaglio
	cutanea	per os	intra polmonare	intra muscolo	
B(a)P	X	X			mammella, polmone, fegato
		X			stomaco
B(j)F	X				pelle, tessuto linfatico
				X	polmone
B(k)F	X				pelle, endometrio
				X	pelle
			X		polmone
Cry	X				pelle
	X				fegato, polmone, tessuto linfatico

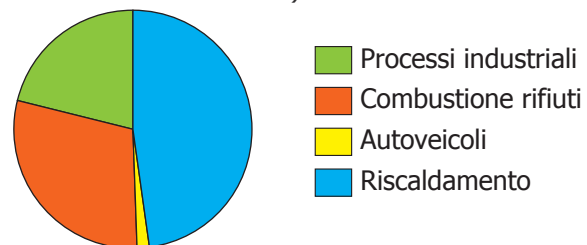
Figura 13

PAH	Attività mutagenica (revertanti / µg)*	Rapporto di mutagenicità rispetto al B(a)P
benzo(a)pirene	93.82	1.000
crisene	62.7	0.668
benzo(a)antracene	50.23	0.535
benzo(b)fluorantrene	28.14	0.299
benzo(k)fluorantrene	28.65	0.305
benzo(g,h,i)perilene	10.68	0.114
dibenzoantracene	41.89	0.446

* Attività mutagenica misurata su *salmonella typhimurium* con attivazione metabolica

Figura 14

PRODUZIONE GLOBALE DI BENZO(a)PIRENE (~ 5000 tonnellate all'anno)

**Figura 15**

Sorgente dell'emissione di B(a)P	Concentrazione (ng/m ³)
Fumi di scarico delle automobili	4000
Industria metallurgica	216000
Inceneritori	11000-52000
Combustioni libere	2800-173000
Fumi di scarico dei camion	1500-36000

Gran parte degli IPA presenti nell'aria sono assorbiti a fini particelle (particolato) (**figura 16**); gli IPA adesi al particolato sono instabili in presenza di UV, ozono e ossidi di azoto, e danno luogo ad altri composti ad azione biologica mal caratterizzata (**figura 17**). Alcuni di questi derivati, come i nitropoliciclici, sono più tossici dei composti di partenza.

Il potenziale effetto cancerogeno degli IPA dopo inalazione, dipende dalla deposizione del particolato, che è massima per il particolato fine (**figura 18**). A livello delle vie aeree superiori si depositano soprattutto le particelle di grandi dimensioni (2-10 μm), mentre a livello alveolare si depositano solo le particelle inferiori a 2 μm . Questo è importante perché a livello alveolare i PAH vengono ossidati dai CYP450 dei macrofagi alveolari, che fagocitano le particelle fini, e così hanno effetto cancerogeno a livello del parenchima polmonare.

I livelli di IPA nell'aria sono fortemente stagione-dipendenti (**figura 19**) con minimi in estate. Gli IPA tendono a essere più alti nelle città più grandi, ma sono presenti nell'aria anche nei piccoli centri (**figura 20**).

Figura 16 inquinanti aerei da prodotti di combustione

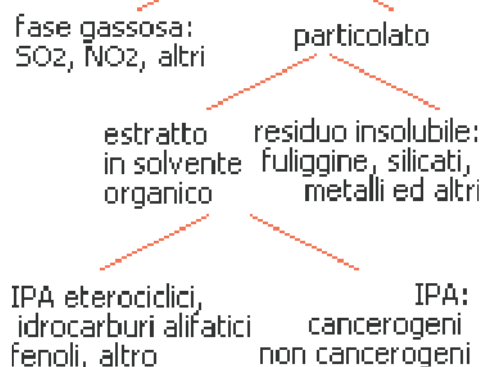


Figura 17

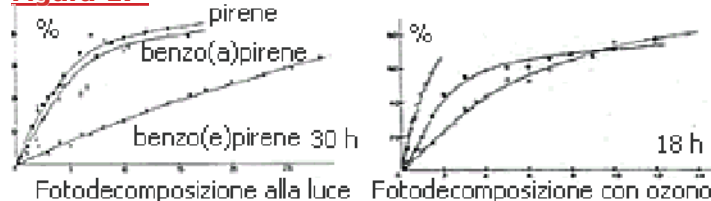


Figura 18

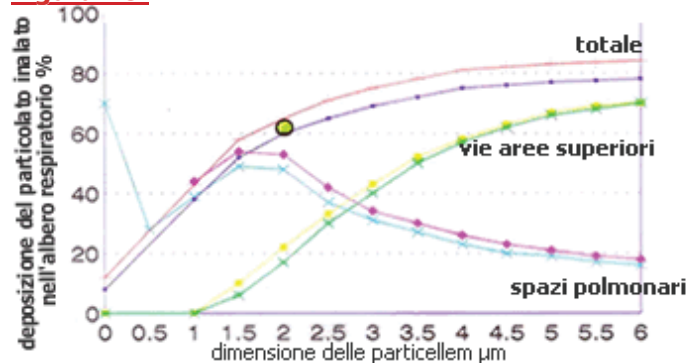
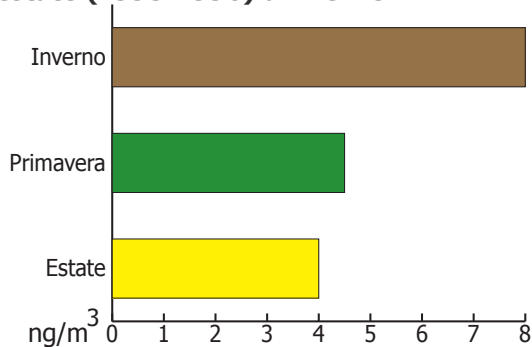


Figura 19

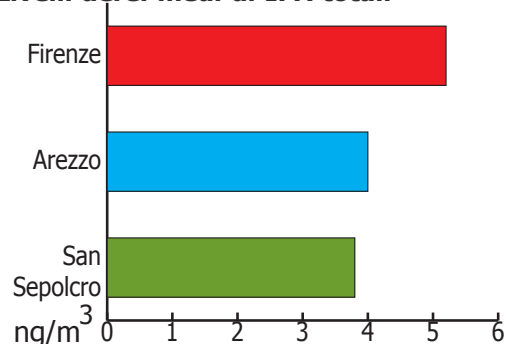
Livelli aerei medi di IPA in inverno, primavera ed estate (1995-1996) a Firenze



Dolara et al., Chemosphere 50, 377-382, 2003

Figura 20

Livelli aerei medi di IPA totali



Idem

Gli IPA sono assai concentrati nel fumo di tabacco, di cui costituiscono i principali cancerogeni, con quantità variabile in funzione del tipo di fumo e di filtro (**figura 21**).

Gli IPA del tabacco provocano la formazione di addotti polmonari, che è assai elevata nei fumatori ed in alcuni ex fumatori (**figura 22**). La **figura 23** riporta alcune stime della deposizione di PAH nel polmone umano. Le quantità assorbite per via respiratoria sono minori di quelle assorbite con gli alimenti, ma hanno effetti locali importanti, forse per la presenza a livello polmonare di cellule attivanti come i macrofagi alveolari.

Da dati ottenuti mediante il dosaggio degli IPA nei principali alimenti della dieta Italiana e considerando la quantità degli alimenti consumati in un anno è stata calcolata l'esposizione media agli IPA in Italia, che è di circa 1 mg/anno.

Una sorgente alimentare importante può essere costituita da parti carbonizzate di carne cotta alla brace (**figura 24**).

Le concentrazioni di IPA negli alimenti italiani sono riportate nelle **figure 25** e **26**, normalizzando i livelli con l'uso dei TEF B(a)P equivalenti (per la definizione dei TEF vedi il capitolo 20 su PCB e PCDD).

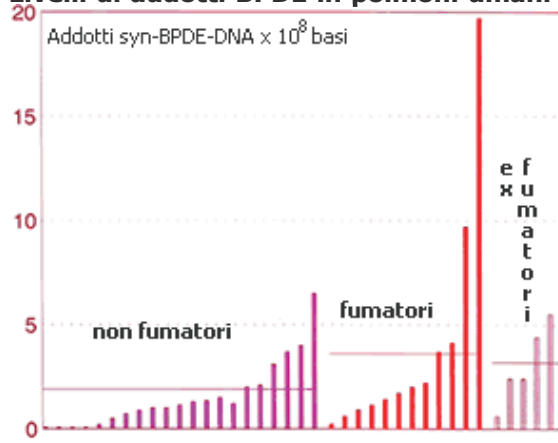
Figura 21

Fumo di sigaretta diretto ($\mu\text{g}/100$ sigarette)	0.5-7.8
Fumo di sigaretta laterale ($\mu\text{g}/100$ sigarette)	2.5-19.9
Ambiente inquinato (ng/m^3)	2.8-760
Fumo di sigaro ($\mu\text{g}/100$ g)	1.8-5.1
Fumo di pipa ($\mu\text{g}/100$ g)	8.5
Fumo di marijuana ($\mu\text{g}/100$ sigarette)	2.9-3.1

Akin et al., J Natl Cancer Inst 57, 191-195, 1978

Figura 22

Livelli di addotti BPDE in polmoni umani



Lodovici et al., Chem Biol Interact 116, 199-212, 1998

Figura 23

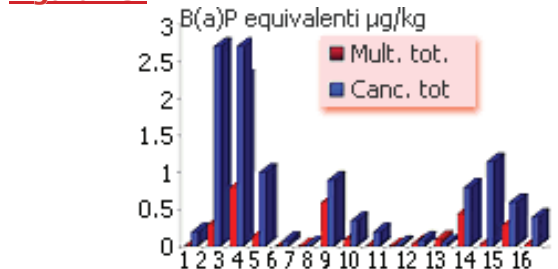
PAH totali assorbiti in un anno dal polmone umano = $(30 \text{ ng}/\text{m}^3) \times (\text{aria respirata} = 23 \text{ m}^3/\text{d}) \times (\text{frazione deposta} = 60\%) \times 365$
 $= 151 \mu\text{g}/\text{anno}$
 PAH totali ingeriti con gli alimenti
 $= (3 \mu\text{g}/\text{d}) \times 365$
 $= 1095 \mu\text{g}/\text{anno}$

Figura 24

PAH	Totale (μg)	Concentrazione di IPA		
		per bistecca	per kg	per 100 cm^2
Benzo(a)antracene	76	5	4.5	0.8
Benzo(g,h,i)perilene	76	5	4.5	0.8
Benzo(a)pirene	133	9	8	1.3
Benzo(e)pirene	97	6.5	6	1.0
Crisene	21	1.5	1.4	0.2
Pirene	286	19	18	2.9

Lijinski e Shubik, Science 145, 52-55, 1964

Figura 25



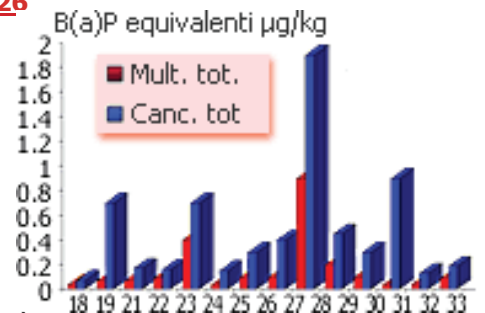
1: cavolo; 2: bietola; 3: zucchine; 4: lattuga; 5: pomodori; 6: patate; 7: mela; 8: mela sbucciata; 9: agrumi; 10: vino; 11: birra; 12: caffè; 13: cioccolato; 14: pasta; 15: pane; 16: cereali

Lodovici et al., Food Addit Contam 12, 703-713, 1995

Per determinare l'esposizione, è importante considerare non solo la concentrazione di IPA ma anche la quantità di alimento ingerita. Infatti, alcuni alimenti contengono relativamente alte concentrazioni di IPA (ad es. la carne alla brace), ma sono consumati in quantità modesta. Altri hanno livelli bassi di IPA (pane e pasta), ma vengono consumati in quantità maggiore. Il contributo relativo all'assunzione di dei diversi alimenti, misurato come quantità totale (μg) di PAH cancerogeni e totali (cancerogeni + non cancerogeni)/kg di peso fresco di alimento è schematizzato nelle **figure 27 e 28**.

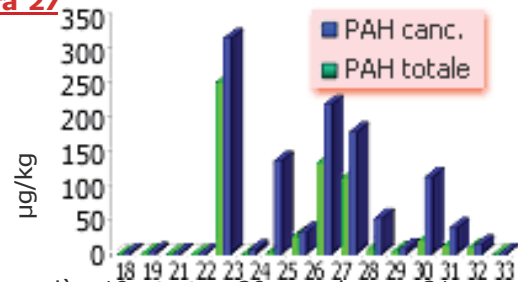
Appare evidente che le fonti principali sono la carne, il latte, la frutta ed i cereali. Il contributo % di vari alimenti nella assunzione complessiva di IPA con la dieta è riassunto nella **figura 29**.

Figura 26



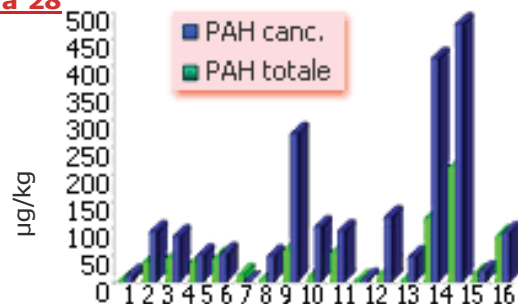
18: baccalà; 19: trota; 20: merluzzo; 21: uovo; 22: latte/yogurth; 23: formaggio; 24: burro; 25: olio; 26: vitello; 28: suino; 30: salumi; 31: coniglio; 32: pollo; 33: fegato
Lodovici et al., Food Addit Contam 12, 703-713, 1995

Figura 27



18: baccalà; 19: trota; 20: merluzzo; 21: uovo; 22: latte/yog; 23: formaggio; 24: burro; 25: olio; 26: vitello; 27: vitello*; 28: suino; 29: suino*; 30: salumi; 31: coniglio; 32: pollo; 33: fegato. *cotto alla brace
Idem

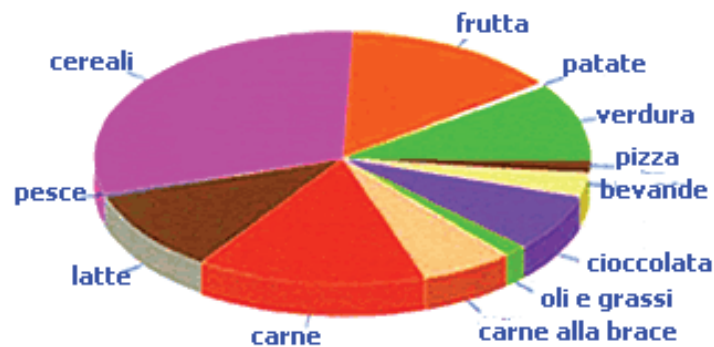
Figura 28



1: cavolo; 2: bietola; 3: zucchine; 4: lattuga; 5: pomodori; 6: patate; 7: mela sbucciata; 8: mela; 9: agrumi; 10: vino; 11: birra; 12: caffè; 13: cioccolato; 14: pasta; 15: pane; 16: cereali; 17: pizza
Idem

Figura 29

Contributo dei vari gruppi di alimenti all'assunzione di IPA



Idem

rox

lezione n. 23

Metalli pesanti

I metalli pesanti sono prodotti di largo uso industriale che hanno una elevata tossicità ambientale. Gli effetti tossici dei metalli pesanti sono stati descritti anche dai Greci (**figura 1**), ma per molti di loro la tossicità non era nota agli antichi, anche se l'arsenico è conosciuto come veleno da secoli ed usato per scopi criminali.

I livelli ambientali dei metalli pesanti variano nel tempo e seguono lo sviluppo economico delle società umane (**figura 2**). Esiste un background di contaminazione ambientale da metalli, ma di gran lunga più importante è l'origine antropogenica (**figura 3**).

La **figura 4** elenca le sorgenti più importanti di contaminazione da metalli e la **figura 5** mostra come la complessa cinetica ambientale dei metalli: infatti, si diffondono nell'atmosfera, in parte vengono depositati sulla terra e trasferiti dai corpi idrici al mare. I sedimenti marini e lacustri in aree inquinate contengono grandi quantità di metalli pesanti e sono spesso usati per determinare il grado di contaminazione (con tecniche di "carotaggio"). Interessanti dati di contaminazione da metalli hanno prodotto le analisi dei carotaggi dei ghiacci perenni (Groenlandia, Siberia).

Alcuni metalli pesanti hanno specifici effetti tossici; alcuni effetti tossici sono però comuni ai metalli pesanti come classe: inibiscono enzimi e proteine contenenti gruppi SH, alterano organuli intracellulari (mitocondri), inducono danno ossidativo e inibiscono le glutation-transferasi (**figura 6**).

Figura 1

Note storiche

- 370 a.C. Ippocrate descrive una colica addominale da Pb in un minatore
- Teofrasto di Erebo (370-287 a.C.) e Plinio (79-23 a.C.) descrivono gli effetti tossici del mercurio e dell'arsenico

Figura 2

Storia della metallurgia e dell'inquinamento da metalli pesanti

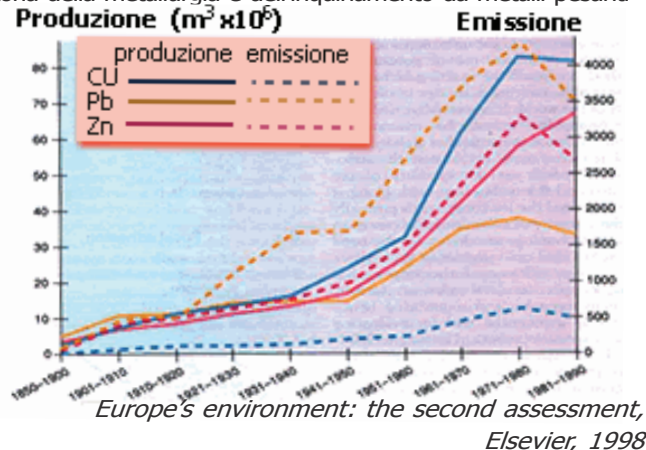


Figura 3

Emissioni planetarie di alcuni elementi

Emissioni planetarie (t/anno)		
Elemento	Naturale	Antropogenica
As	28	78000
Cr	580	94000
Cu	190	260000
Pb	59	2000000
Hg	0.4	11000
Va	650	210000

Figura 4

Origine dei metalli pesanti ambientali:

- industria mineraria, acciaierie
- industria chimica (elettrolitica, plastica e coloranti)
- prodotti di consumo (discariche)
- inceneritori
- combustibili fossili
- pesticidi e fertilizzanti

Figura 5

Vie di trasporto dei metalli pesanti nell'ambiente

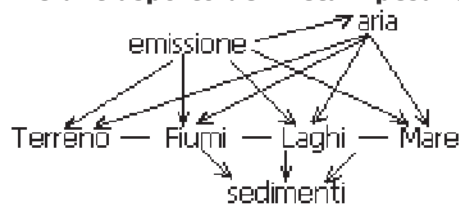


Figura 6

Meccanismi di azione cellulare dei metalli pesanti

- alterazioni degli organuli cellulari
- formazione di specie reattive
- ossidazione degli SH
- inibizione delle glutation-transferasi (GSH-T)

Il Pb è il metallo inquinante più importante degli ultimi 2000 anni. I suoi livelli sono aumentati esponenzialmente con la rivoluzione industriale e con l'uso delle benzine addizionate con antidetonanti (figura 7). Ai tempi dei Romani le tubature terminali degli acquedotti erano di Pb e con vernici a piombo erano verniciate le terraglie (figura 8). Erano di piombo anche alcuni contenitori di vino raffinato (figura 9), il cui gusto piaceva ai Romani (i sali di piombo hanno un sapore dolciastro). È stato calcolato che fino a 200 mg di Pb potevano essere assunte ogni giorno da un romano benestante, una dose certo tossica. In tempi recenti le contaminazioni da piombo sono diventate più rare con l'uso di colori non tossici per la ceramica. Tuttavia il Pb è ancora un importante contaminante in molti paesi (figura 10).

La figura 11 riassume le sorgenti di intossicazione da Pb e le vie di assorbimento. Nei paesi che ancora usano Pb nelle benzine i livelli di Pb intorno alle strade sono molto alti (figura 12). Tuttavia negli USA le intossicazioni dai Pb dei bambini dei ghetti neri (ancora un problema non risolto) derivano dalle abitazioni dipinte con vernici a Pb, con scarsa o nulla manutenzione e sono in parte legate all'abitudine di portare oggetti alla bocca, caratteristica dell'infanzia (pica).

Il Pb, si assorbe per via alimentare e transcutanea e viene trasportato a tutti i tessuti dal sangue (figura 13). Si deposita nello scheletro e nel SNC ed ha una cinetica molto lenta. L'assorbimento dei sali inorganici di piombo

Figura 7

Accumolo di Pb nel ghiaccio della Groenlandia

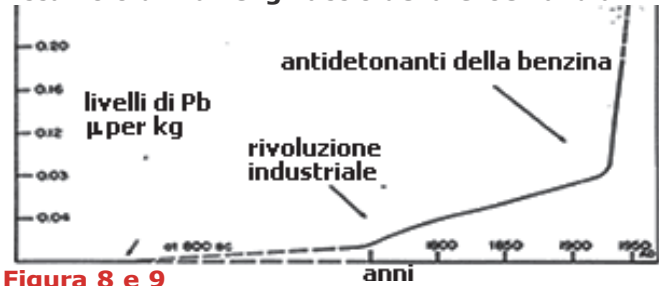


Figura 8 e 9

Stima della assunzione di Pb dei Romani 20-500 mg/d

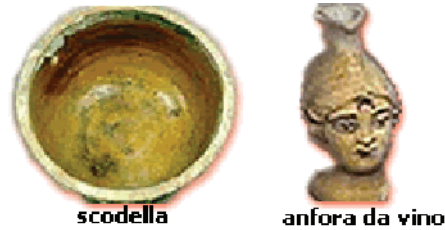


Figura 10

Non è un problema solo storico

- contaminazione industriale (industria delle batterie)
- piombo sulle strade (equalizzatori delle ruote delle auto)
- piombo nella benzina nei paesi poveri

Figura 11

Sorgenti di piombo

benzina ⇨ inalazione

vernici ⇨ ingestione (bambini)

giocattoli, matite ⇨ ingestione (bambini)

vernici per la ceramica ⇨ ingestione

radiator di vecchie auto ⇨ bevande alcoliche illegali

pallottole ⇨ ferite

tubi di piombo ⇨ acqua

pallottole di fucili ⇨ selvaggina

anfore di piombo (Roma ant.) ⇨ bevande

esposizione occupazionale ⇨ cibo, acqua, aria

insetticidi ⇨ cibo

fumo di sigarette ⇨ inalazione

Figura 12

Concentrazione di Pb nel terreno e nelle piante in funzione della distanza da una strada trafficata



Figura 13

Tossicocinetica del Pb:

- assorbimento orale adulti: 5-15%
- ass. or. bambini: 30-40%
- trasporto = globuli rossi
- distribuzione = scheletro (50-95%), SNC
- emivita: 20 anni
- accumolo: ossa—SNC

è molto elevato nei bambini. L'effetto principale a livello cerebrale è la riduzione delle capacità intellettive (**figura 14**). Studi geografici hanno dimostrato carenze intellettuali in bambini esposti ad alti livelli di Pb, rispetto a popolazioni di controllo (**figura 15**).

A livello neuronale il Pb, oltre a provocare danni cellulari, altera la barriera ematrocenale, provoca deficit dei principali sistemi di trasmissione, e inibisce molte metalloproteine (**figura 16**). Questi effetti cellulari provocano una neuropatia periferica, che, quando i caratteri di stampa erano composti a mano, era la malattia professionale dei tipografi. Gli effetti tossicologici del Pb sono funzione dei livelli nel plasma, che possono essere indicatori dello stato di intossicazione (**figura 17**).

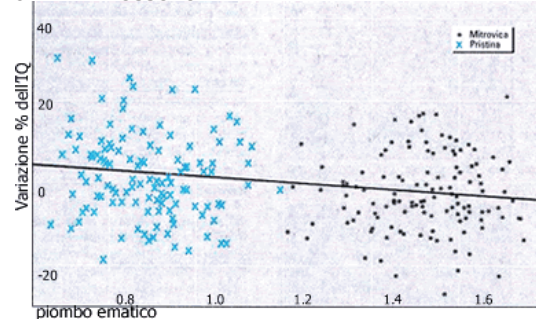
Livelli di Pb relativamente alti ($> 40 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$) possono dare alterazioni uditive, intellettive e neuropatie periferiche. Alti livelli di esposizione provocano anche un accorciamento della vita degli eritrociti (**figura 18**), anemia microcitica (**figura 19**) per blocco della sintesi dell'eme. Un buon test per studiare l'esposizione al piombo è la misura dell'aminolevulinicodeidrasa (ALA), un enzima estremamente sensibile ai livelli di Pb, tappa limitante della sintesi dell'eme. Anche altri enzimi della sintesi dell'eme sono bloccati dal Pb (in rosso nella **figura 20**).

Figura 14

Effetti tossici del Pb. Effetti sul SNC: 2-4 punti di IQ per $\mu\text{g}/\text{ml}$ di aumento nel sangue (range 5-35 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Figura 15

Esposizione al pb ($\mu\text{g}/\text{dl}$) e test di intelligenza in bambini di 7 anni in Kosovo



Wasserman et al., *Environ Health Perspect* 113, 894-899, 2005

Figura 16

Meccanismi di neurotossicità:

- interferenza con Ca e Zn
- deficit sinaptico gabaergico, colinergico, adrenergico, dopaminergico
- alterazione della barriera emato-encefalica
- neuropatia periferica

Figura 17

Effetti neurologici in funzione dei livelli serici di Pb ($\mu\text{g}/\text{dL}$)

	Bambini	Adulti
encefalopatie	80-100	100-120
deficit uditivi	20	
deficit di IQ	10-15	
effetti uterini	10-15	
neuropatie	40	40

Figura 18

Effetti ematologici del Pb

Meccanismi di ematotossicità del Pb (per alti livelli di esposizione):

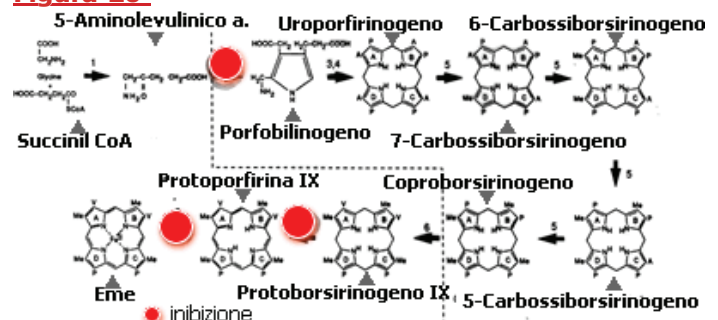
- accorciamento della vita degli eritrociti
- blocco della sintesi dell'eme

Figura 19

Effetti ematologici in funzione dei livelli serici di Pb ($\mu\text{g}/\text{dL}$)

	Bambini	Adulti
anemia	80-100	80-100
inibizione dell'ALA	10	10

Figura 20



Il Pb provoca ipertensione e danno renale grave e deficit riproduttivi (**figura 21**).

Può provocare morte neonatale nelle femmine gravide. Tutti i mammiferi sono sensibili alle azioni del Pb (**figura 22**).

Nelle popolazioni occidentali i livelli di Pb nella popolazione erano alti quando venivano usate benzine con antidetonanti al piombo, ma si sono decisamente ridotti con le benzine verdi (**figura 23**). Tuttavia, come al solito, nei paesi poveri le cose sono rimaste come prima (**figura 24**).

Figura 21

Effetti renali:

- nefropatia acuta e cronica (tipografi, riciclatori di navi, saldatori, industrie delle batterie)
- ipertensione = 1.5-3 mm Hg per ogni raddoppio della concentrazione del Pb ematico (> 7 µg/100ml)

Effetti riproduttivi:

- sterilità
- morte neonatale (effetti genotossici e gametotossici)
- riduzione del numero e della motilità degli spermatozoi

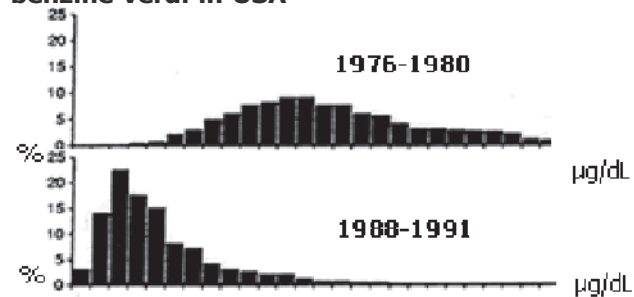
Figura 22

Tossicità del Pb nei roditori

- nessun effetto sulla crescita
- riduzione della longevità
- gravi effetti teratogeni
- riduzione della glicemia, glicosuria e proteinuria
- aumento della suscettibilità alle infezioni
- aumento dell'incidenza di fibrosi miocardiche focali
- aumento delle placche aterosclerotiche nell'aorta
- perdita di peso corporeo negli animali vecchi
- inibizione della ALA-deidrasasi nel cervello
- alterazione dei riflessi condizionati

Figura 23

Livelli ematici prima e dopo l'introduzione delle benzine verdi in USA



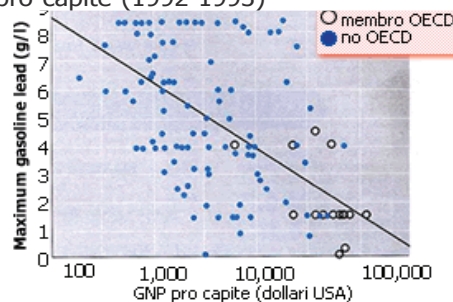
Pirkle et al., Lead in the Environment, NSF/RA 770214 Washington 1997

Figura 24

Concentrazione di piombo massime (g/l) nella benzina (1992-1993, 150 nazioni)



Relazione tra il piombo nella benzina (g/l) e PNL (GNP) pro capite (1992-1993)



Menkes e Fawcett, Environ Health Perspect 105, 270-273, 1997

L'As è un metallo altamente tossico assorbito per via inalatoria e alimentare ed escreto dalla pelle (**figura 25**). Il dosaggio di As negli annessi cutanei è usato per la diagnosi di intossicazione in medicina legale. È clastogeno. Si lega all'ATP inattivandolo (**figura 26**) ed ai gruppi SH (**figura 27**). Nell'organismo viene ridotto ad As trivalente e viene escreto in forma organica a livello renale (**figura 28**). Per somministrazione acuta (circa 100 mg/70 kg) può dare morte. Per intossicazione cronica provoca vasculopatie, cirrosi, tumori cutanei e polmonari (**figura 29**). Le sue concentrazioni ambientali sono basse, salvo che nelle zone dove viene estratto e nelle industrie chimiche e metallurgiche (**figura 30**). In alcune zone del mondo è molto concentrato nel terreno e nell'acqua ed è causa di gravi intossicazioni (**figura 31**).

Un disastro ambientale si è verificato recentemente nel Bangla Desh (**figura 32**) dove con soldi della cooperazione internazionale sono stati costruiti pozzi che poi si sono rivelati contaminati da As; queste popolazioni sono affette da ipercheratosi delle mani (**figura 33**), dei piedi (**figura 34**) e delle fauci (**figura 35**), tumori cutanei e gravi alterazioni di

Figura 25

As

- assorbito per via alimentare e inalatoria
- escreto con pelle, peli, annessi cutanei e urina
- tossico cellulare
- induce rotture cromosomiche (clastogeno)

Figura 26

Meccanismo di azione tossica dell'arsenico V

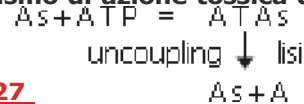


Figura 27

Meccanismo di azione tossica dell'arsenico III

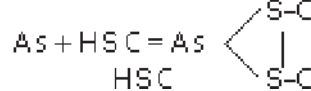
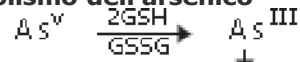


Figura 28

Metabolismo dell'arsenico



escrezione ← Metil e dimetilarsenito

Figura 29

Arsenico

- dose letale acuta umana: 70-100 mg (latenza: 12-24 h, vomito, diarrea sanguigna, crampi, anuria, encefalopatia)
- effetti tossici cronici (neuropatie, vasculopatie, cirrosi)
- ipercheratosi e tumori cutanei
- tumori polmonari (minatori), del rene e delle vescica, linfomi

Figura 30

Sorgenti di arsenico (miniere, industrie metallurgiche, chimiche e vetrarie, alcune acque sotterranee).

Concentrazioni ambientali medie

- paesi industrializzati: 0.1 µg/m³
- vicino ad alcune industrie metallurgiche: 1 µg/m³

Figura 31

Concentrazione dell'arsenico nell'acqua di falda di alcune località nel mondo (µg/ml)

- Ungheria 1-74
- USA 1-48000
- Chile 470-770
- Argentina 100-3800
- Xinjiang 850
- Bengala 197-737
- Bangla Desh 10-1000
- **limite WHO: 10 (µg/ml)**

Figura 32

Siti contaminati da As (in rosso) nelle acque del Bangla Desh



organi interni (**figura 36**). L'unica terapia della intossicazione da As è la somministrazione parenterale di chelanti (penicillamina e dimercapolo) e, naturalmente, l'allontanamento dalla fonte di intossicazione (**figura 37**).

Il Cd è molto utilizzato nell'industria (**figura 38**). È tossico e provoca alterazioni polmonari e tumori della prostata e del polmone nei lavoratori esposti (**figura 39**). La tossicità del Cd a bassi livelli ambientali non è nota.

Il Cr è molto utilizzato nella concia delle pelli. Il Cr usato nell'industria è l'esavalente, mentre nelle cellule viene ridotto a cromo trivalente (**figura 40**). È un oligoelemento essenziale per le cellule per mediare gli effetti dell'insulina, ma alti livelli provoca cancro polmonare e cutaneo, ulcere mucose e cutanee, danni renali (**figura 41**).

Figura 33 e 34
Intossicazione da As, ipercheratosi e cancro nel Bangla Desh



Figura 35
Pigmentazione da As delle mucose



Figura 36
Stima delle morti di As in Bangladesh: 200-300000 per anno
WHO <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs210/en/index.html>

Figura 37
Terapia dell'intossicazione da As

- dimercapolo (3-4 mg/kg)
- penicillamina 2 g/d

Figura 38
Cadmio

- scoperta: 1817
- uso industriale da 50 anni: batterie, galvanoplastica, metallurgia

Figura 39
Cadmio

- assorbimento alimentare (molluschi) respiratorio (sigarette)
- tossicità cronica: polmonite ostruttiva, enfisema
- insufficienza renale (riso contaminato)
- ipertensione
- aumento dei tumori prostatici e polmonari (lavoratori esposti)

Figura 40
Cr (+3, +6)

- +3: sistemi biologici
- +6: industriale (pigmenti, concia delle pelli); ridotto a +3 nelle cellule

Figura 41

- elemento essenziale (legame insulina- recettore)
- tossicità acuta: ulcere mucose, danno renale
- tossicità cronica: ipersensibilità cutanea, cancerogenesi polmonare

Il Hg viene emesso naturalmente nell'ambiente dai vulcani e da alcune attività minerarie; è usato nell'industria chimica ed ha usi industriali molteplici (**figura 42**). Viene metilato con facilità nell'ambiente e ciò lo rende biodisponibile (**figura 43**). Il mercurio metallico è assorbito in quantità trascurabile, mentre l'inorganico si assorbe con facilità (**figura 44**). Il mercurio organico inibisce i gruppi SH ed è specificamente tossico per il cervelletto. Se inalato può dare polmoniti, ma gli effetti più gravi sono a livello renale e cerebellare (**figura 45**). In forma di bicloruro di Hg è estremamente corrosivo e provoca gastroenterite e nefrite acuta. In forma di vapore può dare polmoniti, nefrosi e gengiviti (**figura 46**). Effetti tossici importanti si esercitano anche sulle cellule nervose del feto, come testimonia la tragedia di Minamata, in Giappone (**figura 47**). Il mercurio fu scaricato per anni in mare da una industria chimica e contaminò le sorgenti alimentari della popolazione di pescatori. Gli effetti non furono riconosciuti per anni né dall'industria né dal governo (**figura 48**) e portarono a gravissimi danni a tutta la popolazione. Particolarmente gravi furono gli effetti teratogeni, con gravi alterazioni fetali cerebellari (spasticità) e cerebrali (**figura 49**).

Figura 42

Hg, origine

- evaporazione della crosta terrestre
- attività mineraria
- industria chimica (soda)
- cartiere

Figura 43

Hg, destino ambientale

- ossidazione a Hg metallico
- metilazione
- bioaccumolo

Figura 44

Hg, metallico, biodisponibilità scarsa

- per inalazione (terapia storica della sifilide)
- per ingestione (assorbimento < 0.01 %)

Hg inorganico (+1, +2) assorbimento p.o. 7-15 %
Metilmercurio assorbimento p.o. 90-95 %

Figura 45

Hg, attività biologica

- inibizione enzimatica (SH)
- deposizione nel SNC (cervelletto)

Figura 46

Hg, vapore, tossicologia

- polmonite
- neurastenia, gengivite, nefrosi, tremori

Figura 47

Sindrome di Minamata: nel 1906 una fabbrica chimica Giapponese (Chisso) si stabilisce a Minamata, cittadina di pescatori nel sud del Giappone, inquinando la baia con Hg senza alcun impianto di trattamento dei rifiuti industriali

Figura 48

Nel 1956 sono finalmente riconosciuti i primi casi di intossicazione da metilmercurio, negli adulti e nei bambini. Sono necessari anni di cause civili per il riconoscimento dei danni e l'interruzione dello smaltimento a mare

Figura 49

La sindrome di Minamata



La contaminazione da metalli pesanti è in vari modi legata all'industria. Essendo presenti in numerosi manufatti e oggetti di uso corrente (batterie e computer), i materiali pesanti contaminano le discariche e, in seguito a percolazione, possono inquinare le falde acquatiche e le acque superficiali. Sono presenti nei fumi e nei residui di combustione (ceneri) degli inceneritori (figura 50). È anche per questo che è importante la raccolta differenziata ed il riciclaggio delle batterie. I computer vengono invece scaricati e in parte "riciclati" in condizioni ambientali e sanitarie orrende nei paesi del terzo mondo ed in Cina.

Le emissioni di mercurio in Europa sono concentrate nell'Europa centrale ed orientale (figura 51). Il Hg è presente anche nelle acque della zona del monte Amiata. I trend di emissione di metalli sono in ribasso in Europa con la crisi dell'industria manifatturiera (figura 52). Tuttavia i residui dei metalli pesanti (e di PCB) nei sedimenti dei mari e dei fiumi, ed in particolare nel mare del Nord, sono molto alti e mettono a rischio la pesca e la piscicoltura (figura 53). La figura 54 riporta le concentrazioni di Hg in alcuni tipi di pesce. I livelli più elevati si riscontrano nelle specie carnivore di maggior longevità e dimensioni (tonno, pesce spada, pescecane).

Figura 50

Origine dei metalli pesanti ambientali

- industria mineraria, acciaierie
- industria chimica (elettrolitica, plastica e coloranti)
- prodotti di consumo (discariche)
- inceneritori (ceneri e fumi)
- combustibili fossili
- pesticidi e fertilizzanti

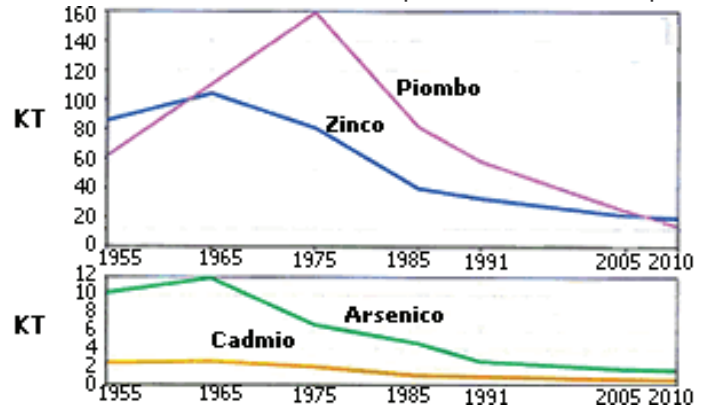
Figura 51

Emissioni di Hg in Europa (1998)



Figura 52

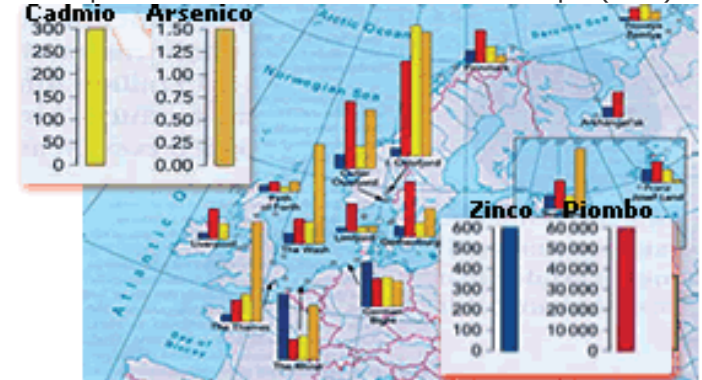
Stima dell'emissione di alcuni metalli pesanti nell'aria in Europa



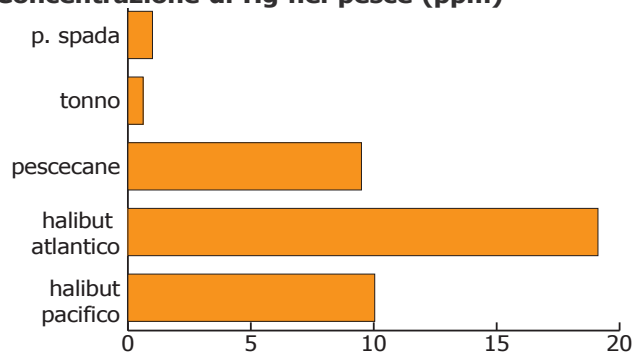
Europe's Environment: the second assessment, Elsevier, 1996, pp. 111-115

Figura 53

Metalli pesanti e PCB nei sedimenti dei mari europei (1998)



Idem

Figura 54**Concentrazione di Hg nel pesce (ppm)**

Aston e Fowler, Sci Total Environ 43, 13-26, 1985

Gli effetti ambientali di un inquinamento da metalli pesanti non sono fino ad adesso chiari. È stato suggerito che i metalli pesanti siano un cofattore importante di molte patologie umane, come la sterilità, l'arteriosclerosi e l'ipertensione (**figura 55**).

Figura 55**Metalli pesanti: effetti sulla salute**

- tumori??
- sterilità???
- arteriosclerosi??
- ipertensione???
- riduzione dell'IQ??

rox

lezione n. 24

Inquinamento dell'acqua

L'acqua può essere contaminata da fattori biotici o da fattori chimici, o da entrambi. I patogeni che possono contaminare l'acqua sono molteplici (**figura 1**) e l'acqua contaminata è il vettore più importante di rischio infettivo. Nonostante l'importanza dell'acqua sarebbe erroneo pensare che l'acqua destinata all'alimentazione e all'igiene sia adesso accessibile a tutte le popolazioni. Variazioni climatiche hanno reso rara la risorsa acqua in varie parti del mondo e vincoli di tipo politico e statale rendono difficile nel mondo moderno la migrazione di popolazioni. Negli ultimi anni si assiste ad un miglioramento dell'approvvigionamento dell'acqua, ma questo fenomeno è più evidente nelle popolazioni urbane, mentre esistono ancora di milioni di individui che abitano in aree rurali che non hanno accesso a fonti di acqua sicura (**figura 2**). Un discorso analogo può essere fatto anche per i servizi igienici. Oltre ad essere difficilmente accessibile, in buona parte del mondo, l'acqua è contaminata per la presenza di scarichi biologici non trattati che finiscono nelle acque superficiali, questo è dovuto o alla presenza di rudimentali impianti di potabilizzazione o alla loro completa assenza.

La presenza di agenti patogeni nell'acqua comporta dei gravi effetti sullo stato di salute di una popolazione. L'effetto più eclatante è l'aumento della mortalità infantile. I bambini sono più suscettibili alle infezioni intestinali, per l'alto metabolismo, caratteristico di tutti gli animali in accrescimento, e per la carenza relativa di difese immunitarie. Questi effetti sono partico-

Figura 1

Microorganismi dell'acqua che causano infezioni umane

- *Campilobacter jejuni*
- *E. coli (enterotossico)*
- *E. coli (enteropatogeno)*
- *Giardia lamblia*
- *E. coli (enteroinvasivo)*
- *Salmonella*
- *Yersinia enterocolica*
- *Shigella*
- *Vibrio cholerae*
- *Aeromonas*
- *Legionella*
- *Pseudomonas*
- *Mycobacterium*
- *Leptospirosi*
- *Helicobacter pylori*

Figura 2

Indicatori di salute di una popolazione

	stato di salute			
	cattivo	modesto	discreto	buono
Numero di paesi	38	31	28	32
Mortalità (età >5 a., N./1000 nati vivi)	118	67	27	9
Aspettativa di vita (anni)	49	61	70	76
% di popolazione con accesso ad acqua pulita	44	52	83	97

Taylor, *In Safety of Water Disinfection*, ILSI, 1993

larmente drammatici con l'uso di latte artificiale per l'alimentazione della prima infanzia, diffuso da criminali campagne propagandistico-commerciali di alcune multinazionali dell'alimentazione. Il latte in polvere viene spesso mescolato con acqua batteriologicamente infetta, e questo, associato con la carenza di anticorpi da latte materni, provoca una vera carneficina nei paesi poveri. Ricordiamo che paradossalmente l'alta mortalità infantile è un fattore che non limita le dimensioni delle popolazioni, ma anzi produce effetti contrari. I genitori infatti tendono a mettere al mondo un numero di figli tanto più alto quanto maggiore è l'incertezza della sopravvivenza dei figli fino alla maggiore età.

L'assenza di risorse per la sicurezza sociale convince infatti i genitori a considerare i figli come una sorta di "assicurazione per la vecchiaia", garantita da un concetto antico di solidarietà del clan familiare. Un'alta mortalità infantile è così inversamente proporzionale al reddito pro capite ed è associata ad una modesta aspettativa di vita (**figura 3**). Ben 38 paesi nel mondo hanno popolazioni in cattivo stato di salute, con una aspettativa di vita media di 49 anni e solo il 44% della popolazione mondiale ha facile accesso all'acqua. In questi paesi la mortalità infantile è assai elevata. Al contrario, esistono paesi nel mondo in buone condizioni di salute (tra cui ovviamente, anche l'Italia), con una mortalità infantile inferiore al 10/1000 ed una aspettativa di vita superiore a 70 anni. La maggioranza della popolazione nei paesi industrializzati ha a disposizione sistemi di acqua centralizzati e controllati da un punto di vista sanitario.

Figura 3.

Alcuni indicatori di salute relativi a bambini < 5 anni

	Africa	Paesi sottosviluppati
Mortalità	198/1000	10/1000
Aspettativa di vita	48	76
Reddito medio pro capite (\$)	320	15000

Taylor, In Safety of Water Disinfection, ILSI, 1993

È stato calcolato che ogni anno centinaia di migliaia di individui si ammalano di malattie infettive derivanti dalla contaminazione dell'acqua (come il colera, il tifo o l'amebiasi). Ogni anno centinaia di milioni di individui manifestano episodi di diarrea grave o sono affetti da malattie protozoarie croniche come la schistosomiasi. La schistosomiasi è una malattia causata da un parassita (*Schistosoma haematobium* o *mansoni* o *japonicum*) che si localizza nei vasi sanguigni dando luogo ad alterazioni croniche del sistema venoso che portano a danni a livello degli organi e a malattie anche mortali.

Lo *Schistosoma* è ospite di alcuni tipi di molluschi e viene trasmesso per via cutanea dopo contatto con acqua infetta. La *Giardia* è un altro parassita dell'acqua a larga diffusione (non in Europa) responsabile di enterocoliti croniche. La maggior parte delle malattie causate dalla contaminazione dell'acqua con batteri sono endemiche in larga parte del mondo. In alcune circostanze possono divenire epidemiche, come avvenne nel caso del colera in Italia negli anni '70 ed in Perù 1992. La contaminazione dell'acqua è una sorgente probabile di malattia anche in individui immunizzati. La correlazione tra inquinamento dell'acqua da agenti patogeni e frequenza di malattie, può essere calcolata (figura 4). Sulla base di queste considerazioni sono stati fissati dei livelli massimi di contaminazione batterica, oltre i quali l'acqua non è considerata potabile. Tuttavia in molti paesi l'unica acqua accessibile rimane quella dei corsi d'acqua superficiali, spesso estremamente inquinati (figura 5).

Figura 4.

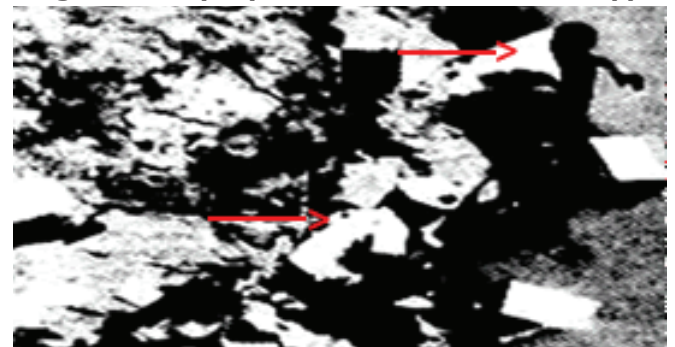
Numero di morti derivanti dal mancato accesso ad acqua sicura distinto a seconda dell'agente patogeno (dati teorici calcolati per una popolazione di 250 milioni)

Organismo	Concentrazione (n. di organismi in 100 l)	Mortalità (morti/100.000)
<i>Giardia lamblia</i>	1 1000	0.07 60
<i>Entamoeba histolytica</i>	1 1000	2363 90760
<i>Rotavirus</i>	1 100	341 7315

Taylor, In *Safety of Water Disinfection*, ILSI, 1993

Figura 5.

Sorgenti di acqua potabile nei Paesi sottosviluppati



La lotta contro l'inquinamento batterico delle acque è uno dei successi dell'igiene contemporanea. Nonostante questa vittoria, persiste ancora in tutti i paesi sviluppati una frazione della popolazione che appare essere esposta ad agenti contaminati attraverso l'acqua. La **figura 6** mostra come anche in un paese ricco come gli Stati Uniti, l'8% dei campioni di feci esaminati risultano contaminati da *Giardia lamblia* (20 milioni di persone!); frequenze basse, ma importanti, si segnalano in USA anche di altre infezioni che hanno origine dall'acqua. La relazione tra accesso ad acqua pulita e mortalità infantile è inversa e molto forte (**figura 7**).

Per risolvere questi gravi problemi e per assicurare il controllo microbiologico della qualità dell'acqua i paesi tecnologicamente evoluti hanno fin dalla fine del XIX secolo iniziati programmi per la costruzione di fognature e di acquedotti con impianti di trattamento centralizzato (**figura 8**). La contaminazione batterica deriva quasi sempre da scarichi impropri di comunità umane o animali (allevamenti intensivi) (**figura 9**). L'inquinamento si misura come concentrazione di carbonio sospeso (**figura 10**). Su questa base si può definire un criterio di "pulizia" dell'acqua (**figura 11**). L'inquinamento può essere misurato determinando il livello di azoto ammoniacale (nelle acque buone tendente a zero) e di ossigeno disciolto (alta ossigenazione è una garanzia di buona qualità) (**figura 12**).

Figura 6

Parassiti derivanti da acque infette presenti nelle feci di cittadini statunitensi (media % di campioni fecali positivi)

- Giardia lamblia: 8%
- Hookworm 1.8%
- Ameba 1.7%
- Ascaris 1.6%

Taylor, In Safety of Water Disinfection, ILSI, 1993

Figura 7

Relazione tra accesso all'acqua pulita e mortalità infantile entro il primo anno di vita

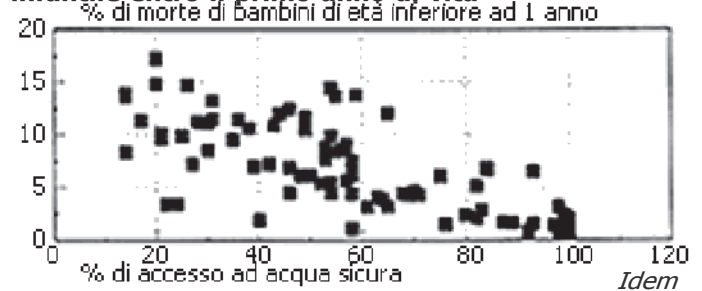


Figura 8

Il trattamento con Cl (introdotto nel '900) è necessario per la potabilizzazione dell'acqua (sterilizzazione di virus e di batteri).

L'ozono è un ulteriore trattamento sterilizzante ma il cloro nell'acqua è necessario per impedire la reinfezione dell'acqua nella rete dell'acquedotto.

Figura 9

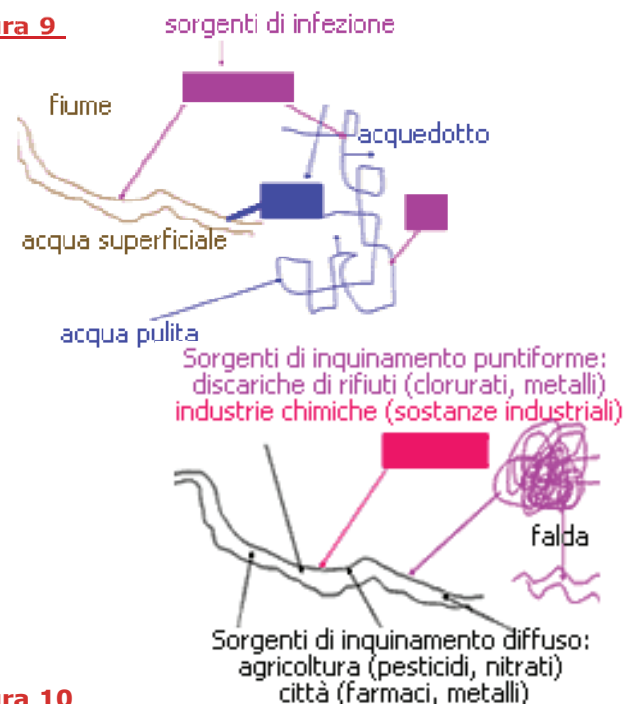


Figura 10

Misure complessive dell'inquinamento dell'acqua:

- quantità di ossigeno necessario per ossidare il carbonio sospeso (Chemical Oxygen Demand) (dicromato di potassio a pH acido)
- quantità di ossigeno necessario alla ossidazione biologica, BOD (Biological Oxygen Demand)

Figura 11

Concentrazioni di C sospeso

- acqua pulita: 3-4 mg/l
- acqua inquinata: 100-300 mg/l

Queste misure sono continuamente aggiornate e rese disponibili dalle buone amministrazioni per le caratteristiche di purezza chimica (**figura 13**) e batteriologica (**figura 14-15**). La contaminazione può essere puntiforme (per esempio da specifiche attività industriali) o diffusa.

L'approccio più efficace adottato in tutto il mondo industrializzato per ridurre i rischi di contaminazione dell'acqua è fin dagli inizi del '900 la clorazione, effettuata prima con cloro e dopo con biossido di cloro (**figura 16, a destra**). Gli effetti battericidi di queste pratiche sono comunque drammatici. La legge italiana ad esempio stabilisce che la conta batterica totale dell'acqua potabile deve essere inferiore a 10 microrganismi/ml, dopo crescita in mezzo di coltura totale a 37°C. L'acqua dei migliori acquedotti è praticamente sterile.

I processi di clorazione sono molto efficaci nell'abbattere la concentrazione di agenti inquinanti batterici e anche di virus. Tuttavia il cloro è un elemento reattivo, e le condizioni di reattività chimica che si creano all'interno delle vasche di trattamento creano le condizioni per una serie di sintesi organiche di derivati clorurati e bromurati. Una soluzione alternativa è quella di accedere a acqua pulita direttamente, come facevano i nostri antenati (**figura 16, a sinistra**).

Figura 12

Classificazione della qualità dell'acqua in funzione del livello di inquinanti

	classe			
	1	2	3	4
O ₂	7-10	3-7	1-3	< 1
NH ₃	< 0.03	0.03-0,5	0,5	> 1
C.O.D., mg/L				< 10

Figura 13

Parametri di qualità dell'acqua del fiume Arno

Rosano		
T	°C	5.9
PH		8
Ossigeno	mg/l	11.2
Saturazione	%	89.4
Solidi sospesi	mg/l	19
T.O.C	mg/l	4.2
C.O.D	mg/l	6
B.O.D. 5	mg/l	4.5
N. amm.le	mg/l	0.3

Da dati contenuti in <http://www.provincia.fi.it>

Figura 14 e 15

Parametri di qualità dell'acqua del fiume Arno

- cromo
- mercurio
- nichel
- piombo
- rame
- zinco
- coliformi
- stp fecali
- salmonelle
- aeromonas
- vibroni
- test tossicità
- clorofilla A
- alcalinità
- ortofosfati
- P-totali
- N-totali
- M.B.A.S.
- T.N.I.
- cadmio
- cromo
- mercurio
- nichel

Idem

Figura 16



Nei processi di potabilizzazione dell'acqua si formano molti sottoprodotti: prodotti alogenati (**figura 17**), aloaldeidi e alochetoni (**figura 18**), alonitrili (**figura 19**). Molte di queste sostanze sono dotate di elevata tossicità. Mentre i trialometani sono sostanze volatili, altri cloroderivati sono meno volatili e non facilmente allontanabili dall'acqua anche dopo ebollizione prolungata. È di particolare interesse anche un composto, noto con la sigla MX (3-cloro-4-(diclorometil)-5-idrossi-2-(H)-furanone) che si forma per clorazione e ossidazione di prodotti di degradazione del materiale organico, dotato di elevata attività mutagenica. Il range di inquinanti organoclorurati misurabili nell'acqua potabile è indicato nella **figura 20**. I più importanti tra questi sono gli alometani.

Per ovviare in parte a questi problemi sono entrati in funzione anche impianti di ozonazione dell'acqua. L'ozono è un composto altamente reattivo che denatura proteine e DNA ed uccide efficacemente virus e batteri nell'acqua. L'ozono viene solitamente usato in aggiunta ai metodi di clorazione e non può sostituirsi ad essi. Infatti, l'acqua trattata con ozono, anche se batteriologicamente pura, deve essere di nuovo clorata per mantenere la sicurezza batteriologica durante il trasporto in rete. È infatti possibile che si abbiano infiltrazioni di acqua inquinata da tubazioni rotte e difettose, e solo la presenza di un alto livello di cloro nell'acqua in rete mette al riparo da tale evenienza. Gli impianti moderni utilizzano una serie di trattamenti in acquedotto (filtrazione,

Figura 17

Sottoprodotti alogenati che si formano nel processo di clorazione per la potabilizzazione dell'acqua

- TRIALOMETANI: cloroformio, bromodiclorometano, dibromoclorometano e bromoformio
- CLORALIO IDRATO
- ALOGENURI DI CIANOGENO: cloruro di cianogeno e bromuro di cianogeno

Figura 18

- ALOPICRINE: cloropicrine e bromopicrine
- ACIDI ALOACETICI: acido monocloroacetico, acido dicloroacetico, acido tricloroacetico, acido monobromoacetico, acido dibromoacetico e acido bromocloroacetico
- ALOCHETONI, ALOALDEIDI, ALOFENOLI

Figura 19

- ALOACETONITRILI: dicloroacetone nitrile, tricloroacetone nitrile, dibromoacetone nitrile, tribromoacetone nitrile e bromocloroacetone nitrile
- MX: 3-cloro-4-(diclorometil)-5-idrossi-2-(H)-furanone

Figura 20

Livelli di inquinanti alogenati nell'acqua

	Range accertabile (µg/l o ppb)
Triclorometano	9-9000
Bromodiclorometano	0.5-50
Tribromometano	5-500
Dicloroacetato	0.3-30
Bromato	0.005-5
Triclorofenolo	38-3800

flocculazione, ozonazione, clorazione) onde assicurare una buona qualità microbiologica dell'acqua, seguiti da clorazione finale dell'acqua prima della immissione nella rete di distribuzione.

Anche i processi di ozonazione tuttavia possono provocare la formazione di sostanze tossiche, quali aldeidi e acidi organici, tra cui la formaldeide, sostanza cancerogena (figura 21), e derivati alogenati ossidati (figura 22), come i bromati e il bromoformio. La presenza di questi composti reattivi, sia ossidati che clorurati, comporta una certa carica di attività mutagenica nell'acqua sia per composti direttamente mutageni (figura 23), che per composti che necessitano di attivazione metabolica (figura 24), attività misurabile con test di mutagenesi batterica (come il test di Ames). Questi dati, raccolti nella città di Firenze, sono stati confermati anche in altre parti del mondo.

Una curiosità che ha interesse per i nuotatori e per fa spesso la doccia è la presenza di sostanze clorate nelle piscine (figura 25) che si assorbono per via cutanea e respiratoria (figura 26).

Figura 21

Sottoprodotti principali della ozonazione dell'acqua

- ALDEIDI: formaldeide, acetaldeide, glicossale e metilglicossale
- ACIDI: ossalico, succinico, formico, acetico, aldo e chetoacidi, piruvico

Figura 22

- PEROSSIDO DI IDROGENO
- PRODOTTI BROMURATI: bromato, acidi acetici brominati, bromoformio, bromopirina e acetoni nitrili brominati

Figura 23

Attività mutagenica dell'acqua di Firenze prima e dopo ozonazione e clorazione. *Salmonella typhimurium*, TA 1538, senza attivazione metabolica

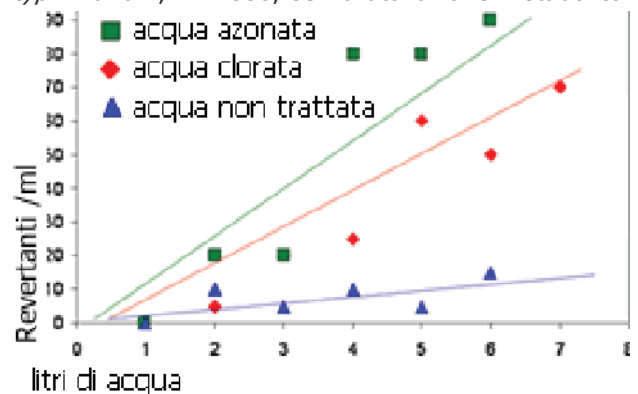


Figura 24

Salmonella typhimurium, TA 1538, senza attivazione metabolica

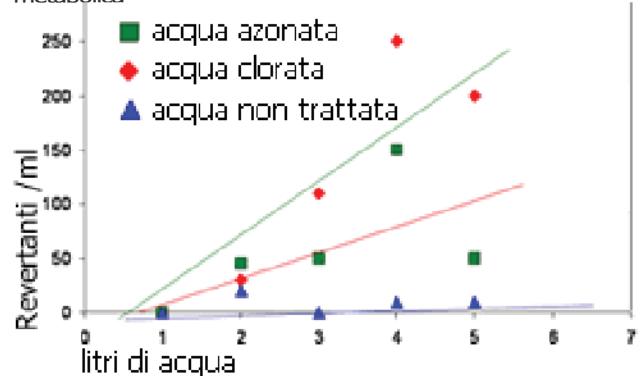


Figura 25

Range di concentrazione media di composti organo-alogenati (cloroformio, diclorobromometano, dibromoclorometano, bromoformio) nell'acqua di piscine private: 21.6-136.4 µg/l

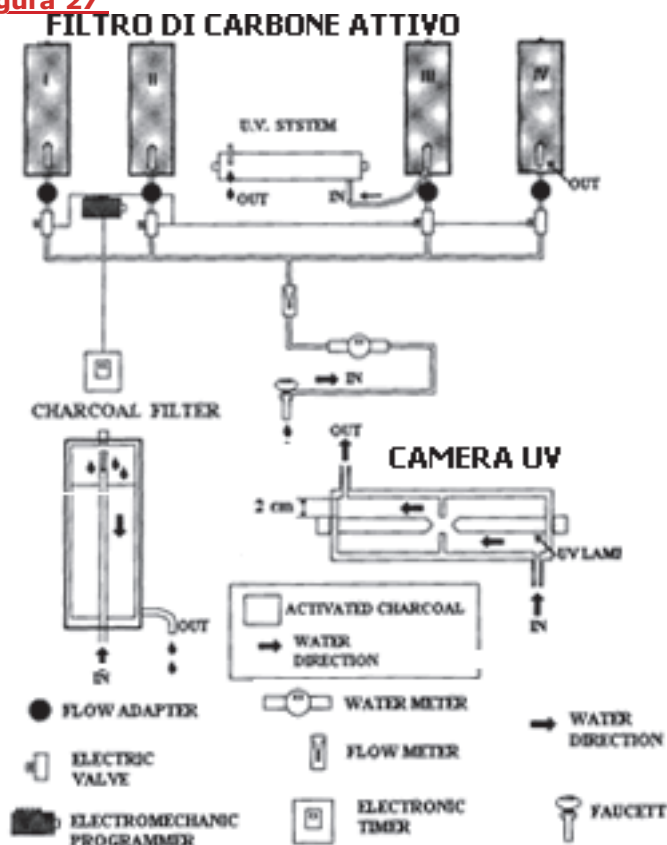
Mariottini et al., comunicazione personale

Figura 26

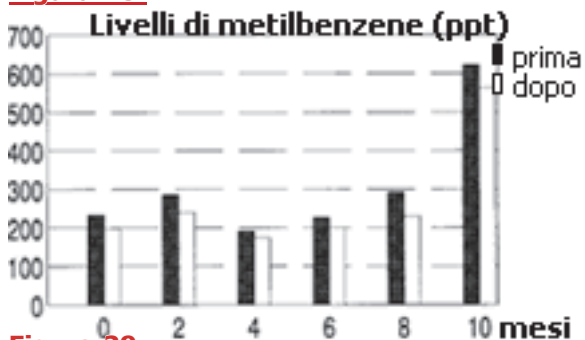
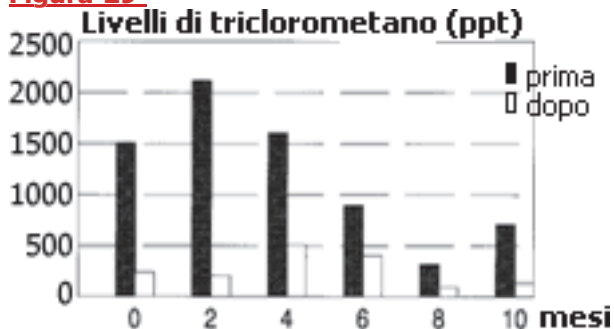
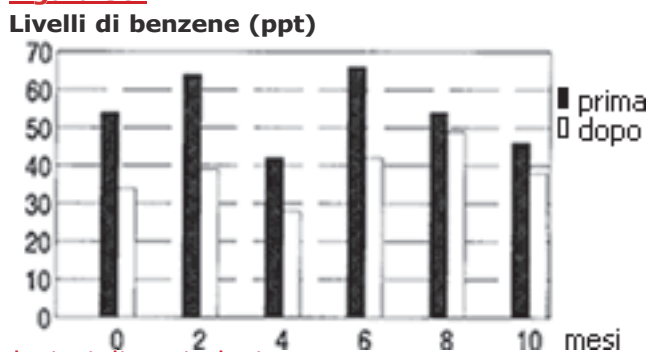


È quindi ormai certo che l'acqua potabile è contaminata da tracce significative di inquinanti organici. Come esempio riportiamo i livelli di alcuni inquinanti nell'acqua dell'acquedotto di Firenze, prima e dopo filtraggio su colonne di carbone attivo (**figura 27**). I livelli di metilbenzeni sono dell'ordine di centinaia di ppt (**figura 28**) e così pure il triclorometano (**figura 29**). Il benzene è al livello di 40-70 ppt (**figura 30**).

Qual è la rilevanza tossicologica di questi composti a basse concentrazioni? Il range di concentrazione dei composti mutageni e cancerogeni dell'acqua clorata è variabile e in funzione del sito e del tempo di campionamento. Infatti, un'alta concentrazione di reagenti organici ed un pesante trattamento con cloro tendono ad aumentare il livello di inquinanti tossici. Acque relativamente povere di substrati organici e poco inquinate (e quindi meno clorate) hanno un basso potenziale mutagenico e cancerogenico.

Figura 27

Dolara et al., Urban Water 2, 13-18, 2000

Figura 28**Figura 29****Figura 30**

Il quesito tossicologico prima esposto si può quindi riassumere con la domanda: “gli inquinanti clorurati dell’acqua sono nocivi alla salute?”. La premessa del discorso è la dimostrazione di effetti cancerogeni degli inquinanti dell’acqua potabile in animali da esperimento (**figura 31**). Una seconda risposta al quesito ci viene offerta, come al solito, dall’epidemiologia. In diverse regioni del mondo sono disponibili dati risultanti da studi a lungo termine sulla qualità dell’acqua. Se si escludono inquinanti dell’acqua di origine industriale, gli altri inquinanti si formano per effetto della clorazione partendo da composti organici naturalmente presenti nell’acqua. Si può quindi estrapolare la condizione di inquinamento dei decenni passati partendo dai dati presenti e assumendo che i livelli di contaminazione e di clorazione siano rimasti invariati nella seconda parte del XX secolo. In relazione alla clorazione dell’acqua sono stati condotti studi caso-controllo, nei quali si confrontano i livelli di alcuni tipi di tumore (i tumori del colon retto, della vescica e del rene) in popolazioni omogenee che usano diversi tipi di acqua (ad es. acque superficiali o acque di falda, a diverso livello di contaminazione). Applicando modelli di statistica matematica (analisi logistica) si è studiato come la variabile in esame (ad esempio il consumo di acqua contaminata da cloroderivati organici) si distribuisca tra i gruppi se un consumo più alto si osserva nei soggetti con tumori rispetto ai controlli). Ad esempio, un rischio relativo (RR) uguale a 2 per il consumo di acqua contaminata significa che la popolazione che consuma tale acqua

Figura 31

Tumori indotti nei roditori da contaminanti di acqua clorata

Campioni di acqua sottoposti a osmosi inversa	% di animali con tumore
non trattati	0
cloro	20
cloramina	32
biossido di cloro	0
ozono	36
7,12-DIMETIL-BENZO(A)ANTRACENE	140 (controllo positivo)

Craun, In Safety of Water Disinfection, ILSI, 1993

ha un rischio di sviluppare tumori (ad esempio alla vescica) doppio rispetto ai controlli. Queste stime di rischio sono accompagnate da limiti fiduciali, ossia da stime di errore statistico che danno un'idea della incertezza della misura.

Quando il limite fiduciale inferiore del RR include il valore di 1, l'aumento è considerato non significativo.

La **figura 32** indica i tipi di tumore che possono avere una correlazione con l'inquinamento dell'acqua. Alcuni di questi studi hanno dato risultati negativi. La maggior parte degli studi mostra un certo effetto (**figura 33**), con una convincente significatività statistica; uno di questi mostra una dose dipendenza (**figura 34**). Nel complesso le osservazioni epidemiologiche indicano un rischio debole o moderato per i tumori alla vescica, non sorprendente, vista la funzione dell'organo, che è facile bersaglio di effetti di inquinanti presenti nell'acqua. Tale effetto debole e moderato è osservato anche nel caso dei tumori del colon retto.

Questa affermazione è contestata da alcuni studi, ma molti autori ritengono che queste osservazioni siano attendibili. La grandezza dell'effetto è però modesta.

La **figura 35** mostra un calcolo delle dimensioni di questo effetto riferito all'Inghilterra, per i tumori della vescica e del retto. Ricordiamo che i fattori di rischio più forti per il cancro alla vescica sono l'esposizione a fumo di sigaretta ed alle ammine aromatiche di origine industriale; i fattori di rischio del cancro al colon retto sono legati a fattori ereditari e al tipo di dieta (alta in grassi e carne cotta ad alta temperatura e povera di fibre e verdura).

Figura 32

Rischi relativi di tumore da inquinanti dell'acqua in studi epidemiologici caso-controllo

Tipo di tumore	Rischio relativo
vescica	1.5, 2.02
colon	1.3, 1.35, 1.99
retto	1.35, 1.54, 1.68, 2.33

Craun, In Safety of Water Disinfection, ILSI, 1993

Figura 33

Rischio relativo di cancro per esposizione ad acqua clorata in studi epidemiologici descrittivi

Tipo di tumore	Rischio relativo	Intervallo di confidenza (95%)
cancro della vescica	1.21	1.10-1.32
cancro del rene	1.57	1.44-1.69
cancro del colon	1.39	1.30-1.48

Koivusalo et al., Am J Epidemiol 148, 704-712, 1998

Figura 34

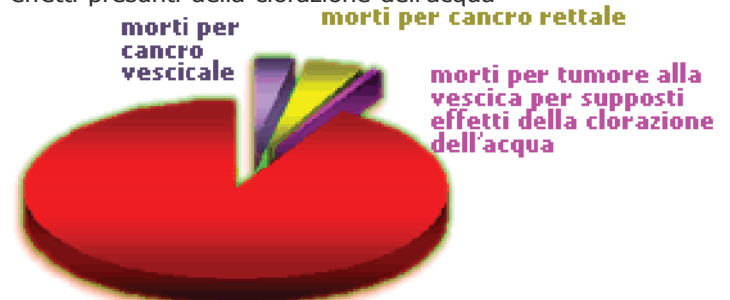
Rischio relativo di tumori in funzione degli anni di esposizione all'acqua clorata

Anni di consumo di acqua clorata	Rischio relativo (limiti di confidenza)
1-19	1.3 (0.7-2.2)
20-39	1.5 (0.9-2.4)
40-59	1.4 (0.9-2.3)
60+	2.3 (1.3-4.2)

Craun, In Safety of Water Disinfection, ILSI, 1993 modificato

Figura 35

Confronto tra il numero totale dei morti per tumore in Inghilterra e morti per tumore alla vescica causato dagli effetti presunti della clorazione dell'acqua



numero totale di morti per cancro (anno 1978)

Aoitte et al., J Epidemiol Community Health 60, 68-172, 2006

rox

lezione n. 25

Inquinamento dell'aria

L'inquinamento dell'aria è una conseguenza delle attività umane e di alcuni fenomeni di origine naturale (incendi, eruzioni). Fisseremo la nostra attenzione sui fattori che determinano la formazione di inquinanti in grado di produrre effetti tossici, in particolare per chi vive in aggregati urbani o in prossimità di sorgenti di inquinamento industriale (ad esempio vicino a una centrale termoelettrica o ad un'industria petrolchimica (sorgenti di inquinamento "puntiforme", per contrasto alle sorgenti "diffuse" come il traffico veicolare).

Le concentrazioni dei gas inquinanti presenti a livello dell'aria possono essere espresse con due diverse unità di misura. Un primo tipo di unità riporta il peso della sostanza (ad esempio in mg) per volume di aria unitario (ad esempio il metro cubo). Il secondo esprime la concentrazione in ppm (parti per milione) o ppb (parti per miliardo, billion in inglese); questa misura rende immediatamente evidente quale sia la concentrazione di ogni inquinante gassoso rispetto al complesso degli altri gas presenti nell'aria. La definizione è spiegata nella **figura 1**.

Le concentrazioni di inquinanti sono spesso espresse come valori medi di 24 h. Le misure in continuo, ormai un fatto acquisito dalla maggioranza delle realtà urbane italiane, indicano chiaramente quanto sia variabile l'emissione e la dispersione di gas inquinanti. Si raggiungono, infatti, i valori massimi di inquinamento nei momenti di alto traffico veicolare e valori minimi nelle ore notturne, ma

Figura 1

Conversione mg/m³ ppm

$$\text{ppm} = \frac{C(\text{mg/m}^3)}{\text{PM}} \times 24.45$$

dove

mg/m³ = µg/l

C = p/V

PM = peso molecolare

24.45 = RT (volume in l occupato da una mole)

anche questi valori sono fortemente condizionati dalle condizioni atmosferiche (vento, temperatura, eventuale inversione termica, umidità).

Uno degli inquinanti più comuni delle città è lo "smog", termine entrato ampiamente nell'uso in tutti i paesi del mondo che deriva dalla fusione delle parole smoke (fumo) e fog (nebbia), e che fu coniato dagli Inglesi per descrivere la terribile combinazione di inquinanti che si formava nell'aria di Londra prima della proibizione dell'uso del carbone e del legno per il riscaldamento domestico. Si distinguono due tipi di smog (**figura 2**), lo smog riducente, caratterizzato principalmente dalla presenza di fumo, con molto particolato sospeso e alti livelli di ossidi di zolfo. Questo smog è caratteristico dei paesi che consumano ancora molto carbone (l'est europeo e la Cina). L'aria è pungente e sporca e contiene bassi livelli di ozono. Lo smog ossidante è invece caratterizzato da alti livelli di ossidi di azoto e idrocarburi sospesi. È caratteristico delle città dei paesi più industrializzati e può, in estate, portare alla formazione di ozono.

Passiamo ora all'analisi dei vari gas inquinanti.

Gli ossidi di zolfo (**figura 3**) sono prodotti dalla combustione del gasolio e del carbone. Il biossido di zolfo è il più comune di questi inquinanti; in condizioni pro-ossidanti può formare anche anidride solforica e acido solforico. La produzione di ossidi di zolfo è massima nel centro-est Europa (**figura 4**).

Gli ossidi di zolfo hanno effetti irritativi sulle mucose dell'albero respiratorio e sugli occhi (**figura 5**).

Figura 2

Smog:

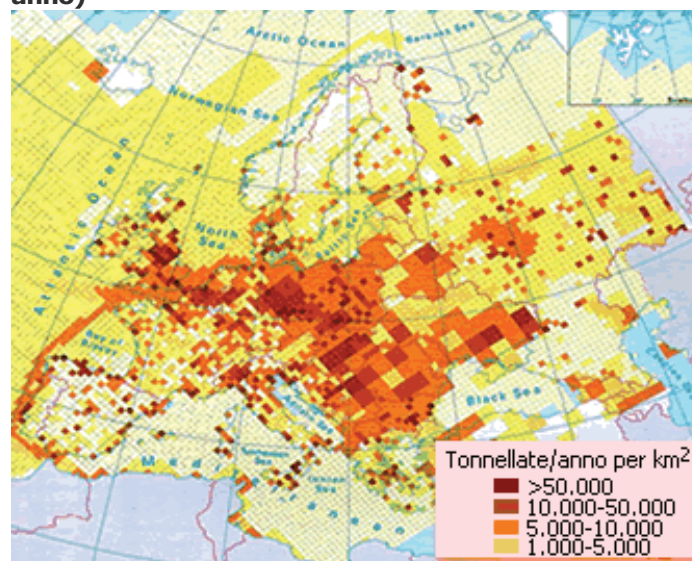
- riducente: SO_x
- ossidante: idrocarburi, NO_x, smog fotochimico

Figura 3

Ossidi di zolfo: 1 ppm = 2.86 mg/m³

Figura 4

Emissione di ossidi di zolfo (tonnellate di S per anno)



Da Europe's environment: the second assessment, Elsevier, 1996, modificato

Figura 5

ppm	Effetti biologici degli SO _x
3-5	cattivo odore
8-12	irritazione faringea
20	irritazione oculare
50-100	broncocostrizione (max dose tollerata per esposizioni brevi)
400-500	danni polmonari (alterazione della clearance bronchiale, infezioni, enfisema)

A concentrazioni molto alte possono dare edema polmonare e morte. Sono percepibili all'olfatto alla concentrazione di 3-5 ppm ed a concentrazioni superiori (5-20 ppm) provocano irritazione della faringe, della laringe e degli occhi. Numerosi studi animali dimostrano che gli ossidi di zolfo a concentrazioni comprese tra 50-100 ppm provocano una broncocostrizione atropino-sensibile nell'esposizione a breve termine; nell'esposizione a lungo termine riduzione della clearance mucociliare (il meccanismo che assicura la rimozione delle particelle inquinanti e dei batteri mediante il continuo movimento delle ciglia dell'epitelio respiratorio che spingono un flusso costante di muco verso l'esterno). Bloccando la funzione muco-ciliare gli ossidi di zolfo provocano un aumento della ritenzione dei batteri all'interno dei polmoni; inoltre, per effetto tossico diretto sulle cellule alveolari provocano l'insorgenza di enfisema (rottura dei setti interalveolari con riduzione della superficie respiratoria).

I limiti massimi di concentrazione nell'aria esterna per l'anidride solforosa sono stati fissati dal DPR 203-88: **(figura 6)**. Le amministrazioni locali dovrebbero mantenere concentrazioni più basse del limite stabilito nel 98% dei giorni dell'anno. Inoltre questo valore non dovrebbe essere mai superato per tre giorni consecutivi. I valori di concentrazione massima stabiliti dal decreto sono assai più bassi di quelli che hanno provocato danni polmonari negli animali da esperimento. Anche nelle città più inquinate è infrequente il superamento di queste soglie.

Figura 6

Limiti degli SO_x (DPR: 203/88)

- 80 µg/m³ media delle concentrazioni annuali
- 250 µg/m³ 98° percentile delle concentrazioni medie di 24 h per anno (il valore non deve essere superato per più di 3 gg consecutivi)

Gli effetti degli NO_x sull'albero respiratorio sono schematizzati nella **figura 7**. La **figura 7** riporta anche il fattore di conversione ppm/m³ per il biossido di azoto ed alcuni suoi effetti biologici. Gli ossidi di azoto sono rappresentati principalmente dal monossido (NO) e dal biossido di azoto (NO₂), che vengono prodotti da qualunque tipo di processo di combustione, anche i più puliti come quelli derivanti dalle caldaie a gas domestiche, e soprattutto dalla combustione dei motori a scoppio. Il biossido di azoto risulta più tossico del monossido. A concentrazioni superiori a 500 µg/m³ il biossido di azoto provoca broncocostrizione, inibizione della clearance mucociliare e quindi aumento delle infezioni respiratorie. I valori limite relativi al biossido di azoto, sono stabiliti in Italia dal DPR 203/88 (**figura 8**). Simili valori vengono indicati come accettabili in altri paesi. I valori massimi ammessi variano da un paese all'altro (**figura 9**). Le concentrazioni di questi inquinanti erano relativamente alte nelle città italiane (**figura 10**), ma si sono ridotte per il miglioramento delle caldaie e dei motori a scoppio.

Il monossido di carbonio (CO) (**figura 11**) è prodotto da tutte le combustioni imperfette. Come inquinante nei centri urbani, è prodotto quasi esclusivamente dal traffico veicolare, tanto che l'andamento temporale dei livelli di traffico e di ossido di carbonio sono spesso coincidenti. Le emissioni di ossido di carbonio possono essere controllate migliorando l'efficienza della carburazione e con l'uso di marmitte catalitiche che ossidano il CO ad anidride carbonica.

Figura 7

Ossidi di Azoto (NO_x) ⇔ NO₂: 1 ppm = 1.88 mg/m³

Livelli	Effetti
200-500 µg/m ³	Broncocostrizione (maggiore effetto negli asmatici)
>500 µg/m ³	Infezioni, inibizione del trasporto mucociliare, broncocostrizione, asma

Figura 8

Valori limite delle concentrazioni di biossido di azoto

Concentrazione (µg/m ³) media annuale	
dal 2005	80
dal 2010	40
	ALLARME conc. 3 h consecutive >400 µg/m ³

Figura 9

Valori massimi nell'aria per il biossido di azoto

(1 µg/m³ = 0.53 ppm)

Nazione o Organizzazione	Concentrazione (µg/m ³)	
Organizzazione Mondiale per la Sanità (media oraria)	190-320	Superare non più di una volta al mese
Stati Uniti (media annuale)	100	Media aritmetica dei valori delle 24 ore
Commissione Europea		
(media annuale)	50	Valore guida: 50° percentile
(media oraria)	200	Valore limite: 98° percentile

Figura 10

Ossidi di azoto (NO_x) valori medie giornaliere in µg/m³, anni 1980-2000

- Torino 20-164
- Genova 2-308
- Milano 260-1000
- Firenze 70-440
- Amsterdam 92-180
- Parigi 140-460

Limite internazionale per aree residenziali: 200 µg/m³

Figura 11

Monossido di carbonio

CO: 1 ppm = 1.145 mg/m³

L'azione tossica dell'ossido di carbonio è legata alla reazione con l'emoglobina e con gli altri enzimi contenenti il gruppo eme. L'affinità dell'ossido di carbonio con il Fe emoglobinico è circa 240 volte superiore a quella dell'ossigeno, per cui si possono ottenere concentrazioni di carbomonossiemoglobina (COHb) molto alte anche a tensioni parziali del CO molto basse. Ciò spiega l'estrema tossicità del CO. In condizioni normali per ottenere la liberazione di una quantità data di ossigeno ai tessuti è necessario un gradiente di ossigeno tra sangue e tessuti; in presenza di CO il gradiente di ossigeno deve essere assai maggiore. In condizioni di estrema saturazione da CO (ad esempio quando la COHb raggiunge il 50% o più), gli scambi di ossigeno diventano insufficienti, sia perché poco ossigeno è legato all'emoglobina, sia perché l'emoglobina diventa, in presenza di CO, un liberatore di ossigeno meno efficiente, perché il CO aumenta l'affinità dell'eme per l'ossigeno. Ciò provoca ipossia tissutale. Livelli crescenti di CoHb portano ad alterazioni della discriminazione spaziotemporale, alterazioni cardiopolmonari, emicrania (primo segno di effetti centrali dell'CO) e infine coma e morte **(figura 12)**.

Gli esperimenti di tossicologia negli animali (cani, conigli, scoiattoli), condotti a concentrazioni comprese tra 50 e 1500 ppm per tempi variabili da pochi minuti ad alcune settimane, dimostrano che l'esposizione cronica ad CO provoca alterazioni cardiache (danno e degenerazione cardiaca) e vascolari (accentuazione dei fenomeni arteriosclerotici) **(figura 12)**. Negli esseri

Figura 12
Carbomonossiemoglobina (COHb), effetti biologici

1%	nessun effetto
2-5%	ridotta discriminazione spazio-temporale
5%	alterazioni cardiache e polmonari
10-80%	emicrania, affaticamento, coma e morte

umani l'esposizione a concentrazioni di 100 ppm per 60 minuti provoca riduzione della tolleranza alla fatica e dispnea. Tali concentrazioni possono indurre angina in pazienti sofferenti di arteriosclerosi coronarica. Una correlazione tra livelli di CO ed un aumento della frequenza di eventi cardiovascolari infausti è stata segnalata da vari studi epidemiologici.

Le concentrazioni di COHb sono variabili all'interno della popolazione. Le concentrazioni più alte sono state misurate tra i tassisti di New York (1.3-5.8% e fino al 13% se fumatori). I valori dei vigili urbani dell'area di Firenze sono riportati nella **figura 13**. I valori di CO nell'aria sono schematizzati nella **figura 14**. I limiti massimi accettabili in Italia sono stati fissati dal DPCM del 28.3.83 (**figura 15**). Una esposizione di 60 minuti a concentrazioni di 50 ppm di CO provoca un livello medio di COHb nel sangue dell'1.6% a riposo, del 2.8% con esercizio lieve e del 3.7% con esercizio pesante. Se la permanenza in atmosfera di CO dura per 24 h, i livelli di COHb sono circa del 7%, indipendentemente dal tipo di attività fisica svolta. Infatti, con tempi di permanenza prolungata in atmosfera inquinata si realizza un equilibrio con il sangue indipendentemente dalla frequenza di ventilazione. I valori di COHb che si ottengono con 100 ppm di CO nell'aria dopo 60 minuti di esposizione sono di 2.7, 5.2 e 7.1% in funzione della ventilazione (cioè nel range degli effetti sintomatici). Dopo 24 h la concentrazione raggiunta diventa invece del 13.6% (gli stessi valori osservati nei tassisti a New York). Un soggetto arteriosclerotico

Figura 13

COHb, concentrazioni nei vigili di Firenze

- Inizio turno fuori ufficio (non fumatori) 3.9 +/- 0.13
- Fine turno (non fumatori) 5 +/-0.18
- Inizio turno (fumatori) 6.1+/- 0.28
- Fine turno (fumatori) 7.1 +/-0.4

Bavazzano, comunicazione personale

Figura 14

CO, concentrazioni ambientali (ppm)

- Mare 0.06-0.5
- Città 1-30
- Fumi di scappamento (auto non catalitiche) 30-80000
- Fumo di sigaretta 20-60000

Figura 15

CO, limiti di legge

- 10 µg/ m³ max concentrazione media in 8 h
- 40 µg/ m³ max concentrazione di 1 h

può avere in queste condizioni di un attacco di angina.

Il benzene è un "nuovo" inquinante dell'aria urbana (**figura 16**). I suoi effetti tossicologici sono stati descritti su popolazioni di benzinai, di lavoratori dell'industria e su fumatori. I livelli di benzene sono aumentati con l'eliminazione del Pb come antidetonante e con la sua sostituzione con miscele di idrocarburi (incluso il benzene) per migliorare il numero di ottano delle benzine verdi. Fino al 1995 il contenuto medio delle benzine in Italia era di circa il 3% in benzene. Alcune case produttrici hanno abbassato volontariamente tale concentrazione all'1%. Gli effetti biologici dimostrati del benzene sono fondamentalmente a carico del sistema emopoietico. Il benzene è un cancerogeno umano, ed è anche cancerogeno negli animali da esperimento. È capace di indurre aberrazioni cromosomiche e micronuclei negli animali da esperimento ed in soggetti professionalmente esposti (**figura 17**). Le concentrazioni di benzene possono essere elevate all'interno di edifici comunicanti con garages e all'interno delle auto. Le fonti di esposizione sono riassunte nella **figura 18**. Non è stato ancora chiarito quanto i livelli di benzene dell'aria di città possono influire sull'incidenza di leucemie.

Il "particolato" presente nell'aria è costituito da una miscela di particelle di varie dimensioni che, quando le dimensioni sono superiori a 20 μm , sedimenta; altrimenti può rimanere sospeso in aria anche per

Figura 16

Benzene (1 ppm = 3.2 mg/m³)

- standard: 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (dal 2005), 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (dal 2010)
- livelli a Firenze: 13-75 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Ponte alle Mosse) 2.4-14 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Boboli)
- sangue, 547 ng/l, (mediana): fumatori 547 ng/l non fumatori 190 ng/l
- livelli in case con garage (USA): 8-31 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
- case di fumatori (USA, inverno) ca 4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
- veicoli in movimento: 50-200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Figura 17

Benzene, effetti biologici

- popolazioni esposte professionalmente: (>1 mg/m³) aberrazioni cromosomiche, leucemia mieloide acuta (LMA), anemia aplastica
- benzinai: (Jacobsen, 1993) LMA, RR= 3.6 (1.7-6.6)
- dose-effetto: (Rinsky et al., 1989) per LMA benzene: $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 40 (SMR 409), 40-199 (SMR 322), 200-399 (SMR 1186), >400 (SMR 6637)

Figura 18

Benzene, sorgenti di esposizione

- 50% fumo (1 sigaretta 60-80 μg)
- 20% interno auto, case con garage (annesso e comunicante)
- 20% esposizione atmosferica
- 5% fumo passivo
- 5% esposizione varie (incluse le occupazionali)

lunghi periodi. Queste particelle originano dalla natura e dall'attività dell'uomo o da incendi boschivi o da eruzioni vulcaniche: il particolato può essere emesso direttamente dalla sorgente (ad es. motori diesel) o formarsi in atmosfera per aggregazioni di particelle diverse (sabbia del deserto, ceneri di combustione), con adesione alle particelle stesse di composti organici più o meno volatili. Ogni combustione produce inevitabilmente particolato. Nel periodo invernale il particolato è più elevato per la maggiore circolazione delle auto e per il riscaldamento domestico. I vecchi motori diesel, ed in particolare i motori diesel degli autocarri, producono una gran quantità di particolato.

Il particolato è importante perché è il vettore meccanico di una serie di sostanze con effetti tossicologici importanti (IPA, Pb, Va, Mn, Zn, Ni). A seconda delle dimensioni delle particelle, il particolato si ferma a diverse altezze dell'albero respiratorio. Le particelle più grandi, con diametro maggiore a 3 μm , si arrestano a livello della laringe, trachea e grossi bronchi.

Le particelle con diametro compreso tra 3 e 1 μm invece si depositano nei bronchioli quelle con diametro inferiore ad 1 μm arrivano fino agli alveoli (**figura 19**). Chiaramente il particolato fine ha effetti tossicologici più rilevanti, data la maggiore superficie della porzione alveolare del polmone, ma è più difficile la sua misurazione. L'esposizione umana a breve termine, a livelli compresi tra 500 a 15000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, provoca un aumento della resistenza meccanica delle vie aeree al transito dell'aria, una diminuzione

Figura 19

Particolato: livello di arresto polmonare

- > 3 μ : vie aeree superiori
- 3-1 μ : bronchi e bronchioli
- < 1 μ : alveoli polmonari

della compliance (elasticità, capacità di adattamento) respiratoria (**figura 20**) e, come per gli ossidi di zolfo e di azoto, una riduzione della clearance batterica e della motilità ciliare. Concentrazioni molto alte di particolato sono relativamente infrequenti nelle città occidentali. Gli effetti polmonari acuti sono stati descritti solo per alte concentrazioni. I limiti massimi fissati in Italia per i livelli di particolato sono illustrati nella (**figura 21**). Durante la grave crisi di smog di Londra negli anni '50 in cui si ebbero migliaia di morti la concentrazione di particolato superò i 50000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Gli effetti tossici acuti del particolato si sommano con gli effetti degli altri inquinanti da combustione, contribuendo ad aumentare la morbilità e la mortalità respiratoria.

L'ozono non è un inquinante primario; esso si forma in presenza di ossidi di azoto e di radiazioni solari (**figura 22**) e in presenza di vari inquinanti organici reattivi insieme all'irraggiamento solare (**figura 23**). I livelli di ozono derivano quindi una cinetica complicata, che risente in maniera importante delle condizioni di irraggiamento. La chimica di tali reazioni di ossidazione è stata di recente chiarita (**figura 24**): gli inquinanti organici che possono dar luogo ad ozono sono molteplici. I più importanti, nell'ordine, (partendo dai meno reattivi) sono: etano, benzene, butano, etilbenzene, toluene, metanolo, etanolo, xilene, etene, propene, isoprene e 1,3-butadiene (**figura 25**).

Gli ultimi composti di questa lista hanno una capacità di formare ozono fino a trenta volte maggiore rispetto ai primi. L'isoprene è particolarmente importante in

Figura 20

Particolato: effetti polmonari

- Fino a 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ aumento delle malattie respiratorie
- > 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ aumento mortalità (Londra, 1963)

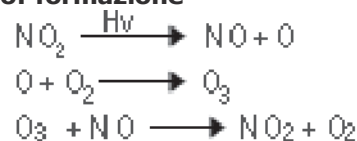
Figura 21

Particolato 10 μm : livelli di riferimento

- 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$: media annuale (dal 2005)
- 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (dal 2010)
- 35 giorni, massimo sopra 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (2205)
- 7 giorni, massimo sopra 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (2010)

Figura 22

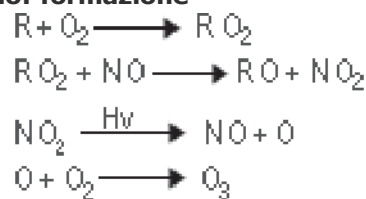
Ozono: formazione



Hv: radiazioni

Figura 23

Ozono: formazione



Hv: radiazioni

Figura 24

Urban Leakage of Liquefied Petroleum Gas and Its Impact on Mexico City Air Quality

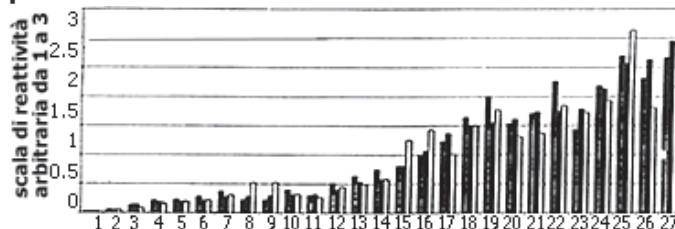
Donald R. Blake and F. Sherwood Rowland

Alkane hydrocarbons (propane, isobutane, and n-butane) from liquefied petroleum gas (LPG) are present in major quantities throughout Mexico City air because of leakage of the unburned gas from numerous urban sources. These hydrocarbons, together with olefinic minor LPG components, furnish substantial amounts of hydroxyl radical reactivity, a major precursor to formation of the ozone component of urban smog. The combined processes of unburned leakage and incomplete combustion of LPG play a significant role in causing the excessive ozone characteristic of Mexico City. Reductions in ozone levels should be possible through changes in LPG composition and lowered rates of leakage.

Black e Sherwood 269, 953-956, 1995, modificato

Figura 25

Reattività differenziale di vari VOCS per la produzione di ozono



1: carbon monoxide, 2: ethane, 3: benzene, 4: methyl-l-butylether, 5: 2,2,4-trimethylpentane, 6: butane, 7: methyl ethyl ketone, 8: ethylbenzene, 9: toluene, 10: 2-methylpentane, 11: methanol, 12: ethanol, 13: ethyl-t-butylether, 14: methylcyclopentane, 15: o-xylene, 16: m,p-xylene, 17: 2-methyl-1-butene, 18: ethene, 19: acetaldehyde, 20: 2-methyl-2-butene, 21: 3-methylcyclopentene, 22: propionaldehyde+higher, 23: 1,2,4-trimethylbenzene, 24: propene, 25: formaldehyde, 26: isoprene, 27: 1,3 butadiene

Idem

quanto prodotto dalle piante come risposta allo stress termico in estate. Le zone di verde sono quindi un catalizzatore per la formazione di ozono in presenza di inquinanti come gli NO_x derivanti dal traffico veicolare. Un'altra sorgente di ozono è il GPL (propano, butano, isobutano), utilizzato in molte città del terzo mondo come gas per cucina. L'effetto del GPL è stato documentato a Mexico City, città perennemente avvolta da un maleodorante strato di smog, dove il maggior determinante degli alti livelli di ozono è proprio il GPL, derivante da fughe nei procedimenti di travaso, da una non perfetta combustione e da un parco macchine non moderno. Nelle città europee è soprattutto il metano ad essere utilizzato in cucina, e lo sviluppo della trazione a GPL è troppo modesto perché rappresenti un fattore significativo. Gli idrocarburi volatili (i cosiddetti idrocarburi non metanici), che insieme agli ossidi di azoto costituiscono i precursori dell'ozono troposferico, sono una presenza costante nell'aria delle città. La loro presenza nell'aria dà luogo ad effetti tossici diretti, mal conosciuti se non per alcuni di essi, come l'isoprene. Nei periodi di alta insolazione sono la causa fondamentale dell'inquinamento fotochimico.

Gli effetti dell'ozono sono riassunti nella **figura 26**. L'ozono ha un effetto irritante alla gola e alle vie respiratorie, aumenta la gravità dell'asma ed è un fattore facilitante delle infezioni respiratorie.

In funzione dei livelli nell'aria di ozono, sono considerate una serie di misure di allarme e viene consigliata la riduzione dell'attività fisica (**figura 27**).

Figura 26

OZONO (1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ = 0.5 ppb (parti per miliardo o 0.001 ppm))

Dosi	Effetti
400-1000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Riduzione motilità mucociliare, danni cellulari, edema, distruzione degli alveoli polmonari e infezioni respiratorie
200-500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Broncocostrizione, ipersensibilità bronchiale e irritazione oculare

Limite WHO: 120 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (max orario), 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (media)

Figura 27

Livelli di ozono (European Council Directive 92/72/EEC)

Descrizione	Criteri	Valori
Informazione della popolazione	Media oraria	180 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (90 ppb)
Allarme per la popolazione	Media oraria	360 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (180 ppb)
Limite consigliabile per la salute	Media di 8 ore	<110 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (55 ppb)
Limite per la protezione delle piante	Media oraria	200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (100 ppb)
	Media di 24 ore	65 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (33 ppb)

I livelli di ozono consigliati dal WHO sono inferiori a 60 ppb (figura 28).

Nei periodi invernali in Italia le concentrazioni sono più basse (figura 29), ma questi livelli sono spesso facilmente superati soprattutto nelle città molto inquinate e soleggiate intorno al mediterraneo (figura 30). Si hanno così frequenti superamenti dei livelli di soglia (figura 31).

Figura 28

Livelli di riferimento per l'ozono

- Non più di 25 giorni con concentrazione media di 8 h $> 120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (2005)
- Non più di 8 giorni con concentrazione media di 8 h $> 120 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (2010)
- Informazione della popolazione concentrazione oraria $> 180 \mu\text{g}/\text{m}^3$
- Allarme concentrazione oraria $> 240 \mu\text{g}/\text{m}^3$

Figura 29

Quantità di ozono e idrocarburi non metanici a Firenze

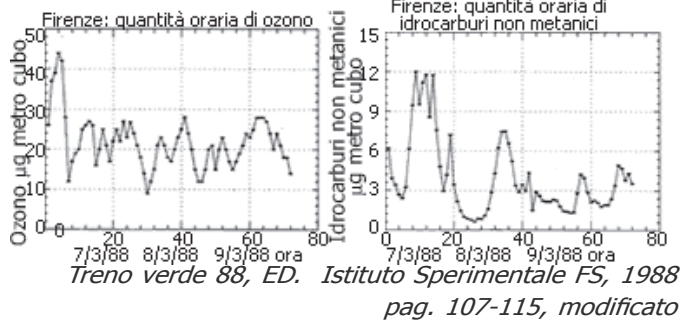
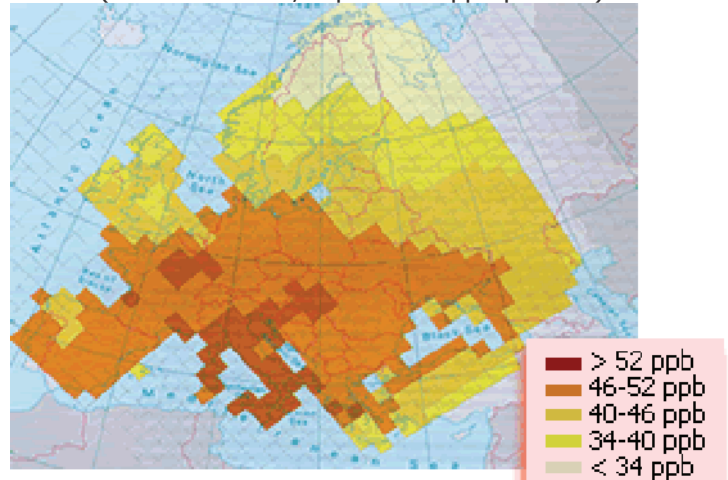


Figura 30

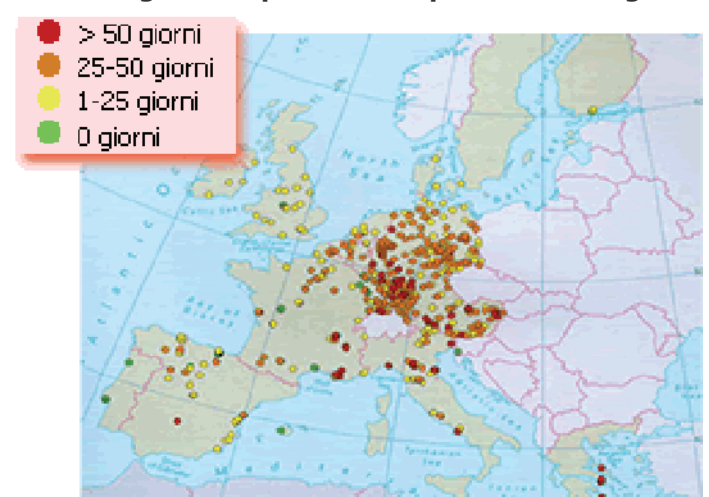
Concentrazione massima giornaliera estiva di ozono (media di 5 anni, espressa in ppb per km²)



Da *Europe's Environment: the second assessment*, Elsevier, 1996, pp. 97-103, modificato

Figura 31

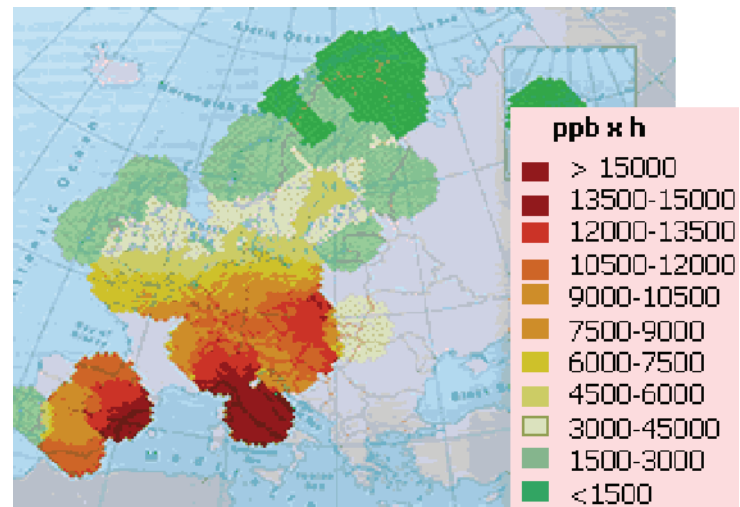
Numero di giorni nei quali l'ozono supera i valori di soglia



Idem

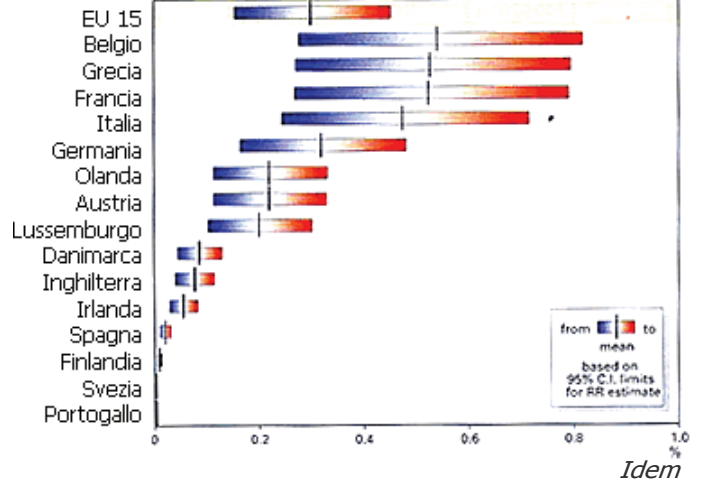
L'esposizione della popolazione ad alti livelli di ozono è in queste zone assai elevata (figura 32), e ciò porta ad un dimostrabile aumento della morbilità (aumento di malattie e di ricoveri ospedalieri) (figura 33).

Figura 32
Esposizione cumulativa all'ozono in Europa, nel periodo maggio-luglio 1995 (ppb x h)



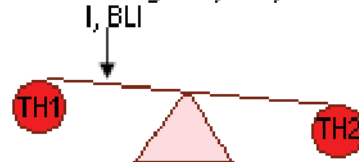
Da Europe's Environment: the second assessment, Elsevier, 1996, pp. 97-103, modificato

Figura 33
Ricoveri ospedalieri attribuibili ad alte concentrazioni di ozono



Alti livelli di NOx e di ozono sono concause dell'asma; tuttavia l'asma dipende anche dalle condizioni del sistema immunitario. L'esposizione a germi nell'infanzia aumenta le cellule immunocompetenti (TH1) che producono anticorpi antibatterici completi e riduce invece le cellule che producono anticorpi allergizzanti (TH2) (figura 34). Situazione inversa si ha con basso inquinamento ed alta igiene. Società poco orientate all'igiene hanno quindi minor insorgenza di fenomeni di asma, anche con alti livelli di inquinamento. Ad esempio, prima del crollo del muro di Berlino la DDR aveva meno asma che la RDT, nonostante l'inquinamento dell'aria fosse maggiore.

Figura 34
Relazione tra inquinamento (I) e basso livello di igiene (BLI) e malattie allergiche:
 situazione 1 (alto inquinamento I e basso livello di igiene, BLI)



TH1: linfociti con anticorpi completi;
 situazione 2 (basso inquinamento e riduzione della carenza di igiene)

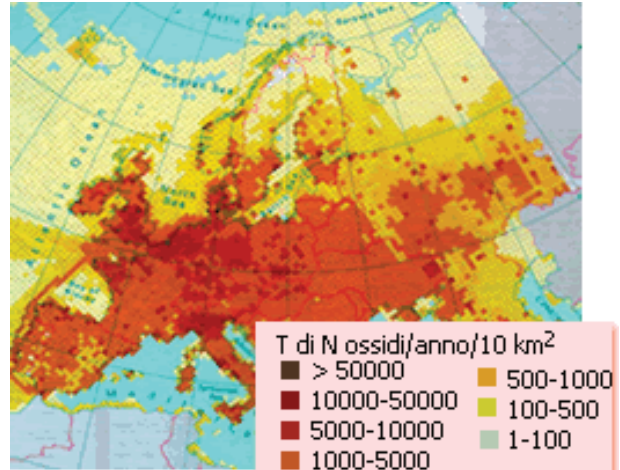


TH2: linfociti con anticorpi allergizzanti

La **figura 35** riporta i trend di emissione in Europa di ossidi di azoto e di ammoniaca, la **figura 36**, mostra che i trend di emissione di NOx e VOCs sono in diminuzione negli ultimi anni, seppure con lentezza (**figura 37**).

Figura 35

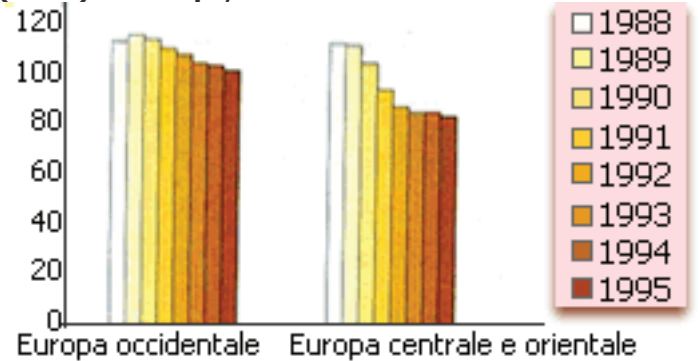
Emissione di ossidi di azoto e ammoniaca in Europa



Da *Europe's Environment: the second assessment*, Elsevier, 1996, pp. 72-93, modificato

Figura 36

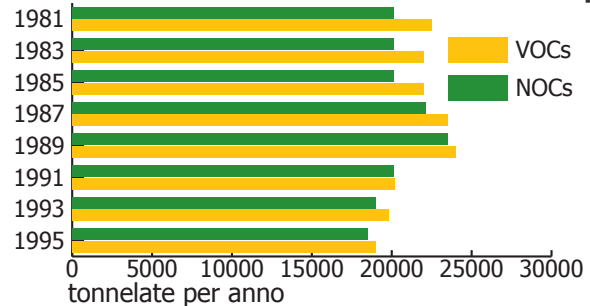
Emissione di NOx e di idrocarburi organici volatili (VOCs) in Europa, % dei valori del 1988



Ivi pp. 94-108, modificato

Figura 37

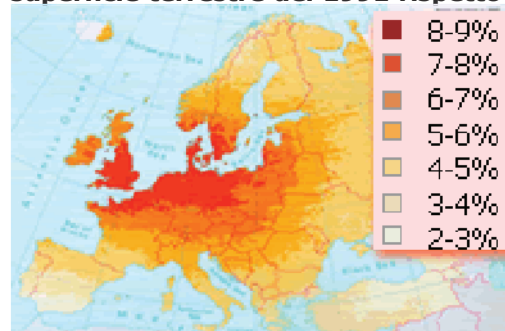
Emissione di NOx di azoto e di VOCs in Europa



Idem

Figura 38

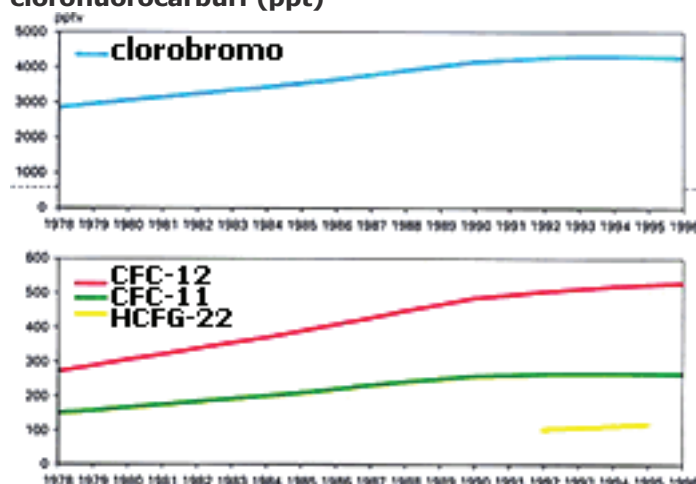
Aumento % della dose di UV a livello della superficie terrestre del 1991 rispetto al 1980



Idem

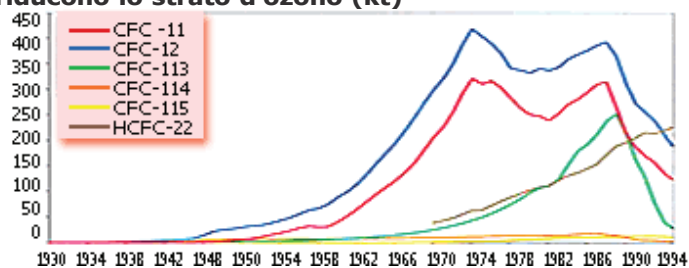
È invece aumentata l'esposizione a raggi UV (**figura 38**). Infatti le sostanze che riducono lo strato di ozono stratosferico (alogeni, CFC) sono state elevate per anni (**figura 39**) anche se adesso sembrano in diminuzione (**figura 40**), perché vietate da alcuni governi (altri non hanno aderito al bando) (**figura 41**).

Figura 39
Concentrazione troposferica di alogeni e di clorofluorocarburi (ppt)



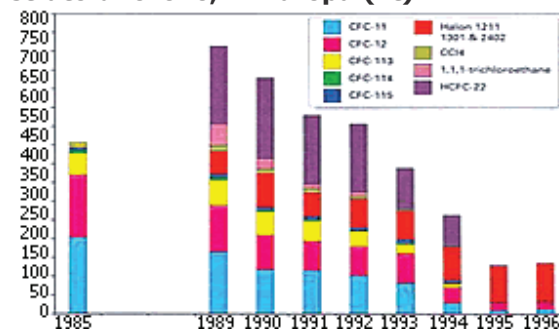
Da *Europe's Environment: the second assessment*, Elsevier, 1996, pp. 94-108, modificato

Figura 40
Emissione globale delle principali sostanze che riducono lo strato d'ozono (kt)



Da *Europe's Environment: the second assessment*, Elsevier, 1996, pp. 60-71, modificato

Figura 41
Produzione di alcune sostanze che riducono lo strato di ozono, in Europa (kt)



Idem

Figura 42
Segnalazioni di un aumento dei ricoveri ospedalieri per inquinamento dell'aria da particolato

- USA
- Spagna
- Finlandia
- Canada

Figura 43
Rischio relativo (RR) di mortalità complessiva comparando la città USA più inquinata con la meno:

- Non fumatori 1.19 (0.9-1.6)
- Fumatori 1.32 (1.04-1.7)

Laden et al., *Am J Respir Crit Care Med* 173, 667-672, 2006

La massa complessiva di dati tossicologici sui singoli inquinanti dell'aria, come sempre succede, non convince gli "ecosceettici", cioè coloro che non credono alla pericolosità dell'inquinamento ambientale. Per convincere gli ecosceettici sono continuati in tutto il mondo studi sugli effetti indesiderabili dell'inquinamento dell'aria (figura 42). Una autorevole opinione al riguardo ci viene da un gruppo di epidemiologia della Harvard University (figura 43). Lo studio è basato su un follow up di mortalità di 16 anni

di 8111 adulti degli Stati Uniti, in città con diverso livello di inquinamento. I fattori di rischio per inquinamento dell'aria sono stati calcolati comparando la mortalità specifica per ogni causa dei soggetti che vivevano nelle città inquinate rispetto a quelli che vivevano nelle città meno inquinate. I dati dimostrano un effetto dell'inquinamento sulle morti da tutte le cause per malattie cardiopolmonari nel loro complesso, significativo solo tra i fumatori. Gli stessi autori dimostrano una relazione lineare significativa e positiva (la mortalità generale aumenta con l'aumentare dell'inquinamento) per il particolato, per gli ossidi di zolfo, ma non per l'ozono.

Abitare in città, secondo epidemiologi di Roma, è associato ad un rischio maggiore di infezioni respiratorie e otiti nell'infanzia (**figura 44**). Gli effetti degli inquinanti dell'aria sulla cancerogenesi polmonare sono spesso oscurati dall'effetto prevalente e determinante del fumo di tabacco. Studi fatti in Polonia dimostrano che l'effetto dell'aria inquinata è modesto per i non fumatori (rischio relativo di 1.14 per cancro del polmone) mentre l'effetto dell'inquinamento dell'aria è moltiplicativo per i fumatori anche se professionalmente esposti, che manifestano un rischio relativo di cancro al polmone di quasi 14 volte più alto rispetto ai non fumatori, che vivono in città con aria pulita. Infine, secondo due studi italiani, sia pure di piccola dimensione, c'è anche un aumento del rischio di sviluppo di tumori associato alla vita di città, anche se quantitativamente modesto, per i non fumatori sia a Roma (**figura 45**) sia a Firenze (**figura 46**).

Figura 44

Rischio relativo (RR+/-95%CL) di malattie respiratorie infantili nell'area urbana di Roma rispetto ad una area rurale

- Tosse e catarro 1.5 (1.06-2.2)
- Otite 1.3 (1.06-1.6)
- Asma 1.3 (0.9-1.6)
- Polmonite 1.6 (1.05-2.6)

<http://www.miw.it/Inquinamentodatraffico7.htm>

Figura 45

Rischio relativo (RR), corretto per il fumo, di tumori polmonari a Roma rispetto ad una area rurale

- Maschi 1.13
- Femmine 1.12

Idem

Figura 46

Rischio relativo (RR), corretto per il fumo, di tumori polmonari a Firenze rispetto ad una area rurale

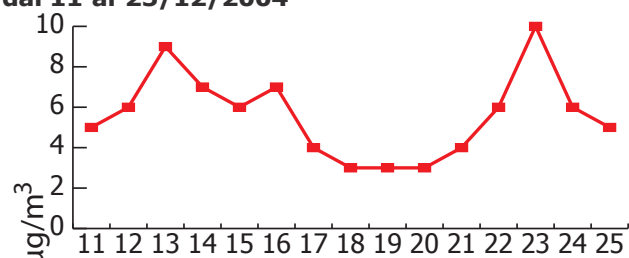
- Maschi 1.32
- Femmine 1.79

Inquinamento atmosferico urbano e salute in Toscana, CSPO, 2005, pp. 35-58

Le condizioni di qualità dell'aria sono monitorizzate da centraline automatiche nelle maggiori città italiane, che segnalano "on line" i livelli di biossido di zolfo (**figura 47**), di biossido d'azoto (**figura 48**), di ossido di carbonio (**figura 49**), di ozono (**figura 50**), di particolato (PM10) (**figura 51**). In alcune centraline sono disponibili anche i valori di PM 2.5, più rilevanti da un punto di vista sanitario.

Figura 47

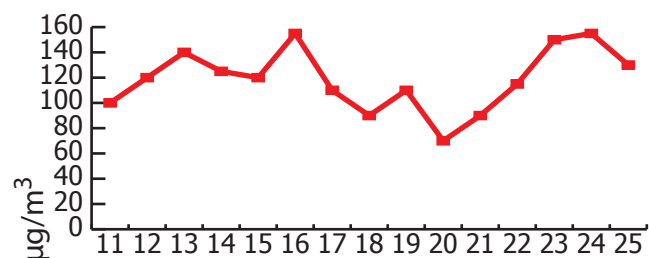
Livelli di biossido di zolfo nell'aria fiorentina dal'11 al 25/12/2004



<http://server-nt.provincia.fi.it/ambiente/aria/pim/scripts/listainq.asp?sceltamenu=202&Inq=1&LastData=9/1/2005>

Figura 48

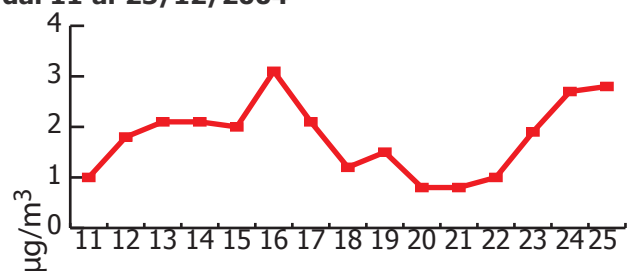
Livelli di biossido di azoto nell'aria fiorentina dal'11 al 25/12/2004



Idem

Figura 49

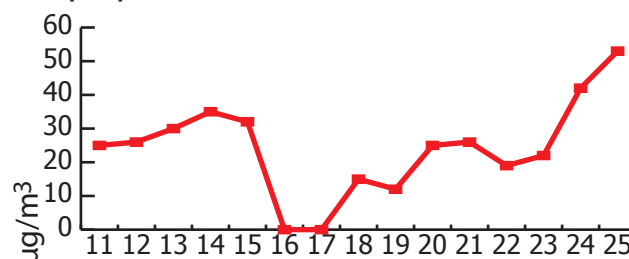
Livelli di monossido di carbonio nell'aria fiorentina dal'11 al 25/12/2004



Idem

Figura 50

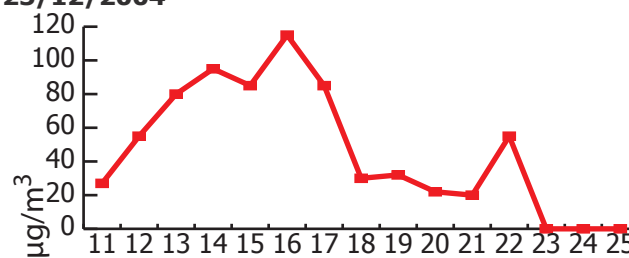
Livelli di ozono di zolfo nell'aria fiorentina dal'11 al 25/12/2004



Idem

Figura 51

Livelli di particolato nell'aria fiorentina dal'11 al 25/12/2004



Idem

rox

lettore consigliato

Lecture consigliate

Parte generale

Cantelli Forti, Galli, Hrelia *Tossicologia Molecolare e Cellulare*, UTET, 2000.

Casarett and Doull's, *Toxicology, VI Edition*, Mc Grow-Hill, 2001 VI Edizione , Ed. Italiana, EMSI ,2006.

Greim, Deml. *Tossicologia*, Zanichelli, Bologna, 2000.

Per I tumori

Lucio Luzzato, *Capire il Cancro*, Rizzoli, 2006

Per la genetica delle popolazioni

Cavalli Sforza, Menozzi, Piazza, *Storia e Geografia dei Geni Umani*, Adelphi, 1997

Per la tossicologia ambientale

Europe's Environment, *State and outlook 2005*, European Environment Agency, 2005

Per l'epidemiologia italiana

Geddes, *La Salute degli Italiani*, Nuova Italia Scientifica, Roma, 1994

Per le Diossine Policlorurate

Veterans and Agent Orange, *Institute of Medicine*, Washington DC, 1994

Per l'ecologia generale

B. Commoner, *Il Cerchio da Chiudere*, Garzanti, Milano, 1986.

J. Diamond, *Collapse. How societies choose to fail or succeed*, Penguin, 2005

rox

indice analitico

Indice analitico

- 1,2,3,4,6,7,8-eptaCDD 177
- 1,2,3,4,6,7,8-eptaCDF 177
- 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD 175
- 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF 175
- 1,2,3,4,7,8,9-eptaCDF 177
- 1,2,3,4,7,8,9-eptaCDF 177
- 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF 175
- 1,2,3,4,7,8-esaCDD 177
- 1,2,3,4,7,8-esaCDF 177
- 1,2,3,4,7,8-HxCDD 175
- 1,2,3,4,7,8-HxCDF 175
- 1,2,3,6,7,8-esaCDD 177
- 1,2,3,6,7,8-esaCDF 177
- 1,2,3,6,7,8-HpCDF 175
- 1,2,3,7,8,9-esaCDD 177
- 1,2,3,7,8,9-esaCDF 177
- 1,2,3,7,8,9-HxCDD 175
- 1,2,3,7,8-Pe-CDD 175
- 1,2,3,7,8-Pe-CDF 175
- 1,2,3,7,8-pentaCDD 176
- 1,2,3,7,8-pentaCDD 177
- 1,2,3,7,8-pentaCDF 176
- 1,2,3,7,8-pentaCDF 177
- 1,2,3,6,7,8-HxCDD 175
- 1,2,3,7,8,9-HxCDF 175
- 10-eossido 192
- 2,3,4,5-tetraclorobifenile 171
- 2,3,4,6,7,8-esaCDF 177
- 2,3,4,6,7,8-Hx-CDF 175
- 2,3,4,7,8-PeCDF 175
- 2,3,4,7,8-pentaCDF 176
- 2,3,4,7,8-pentaCDF 177
- 2,3,7,8-TCDD 171, 174, 175
- 2,3,7,8-TCDF 175
- 2,3,7,8-tetraCDD 176
- 2,3,7,8-tetraCDD 177
- 2,3,7,8-tetraCDF 176
- 2,3,7,8-tetraCDF 177
- 2,3-diclorodibenzo-p-diossina 171
- 2-aminopurina 49
- 3,3',4,4',5,5'-esaCB 171
- 3,3',4,4',5-pentaCB 171
- 3,3',4,4'-tetraCB 171
- 3,4,4',5-tetraCB 171
- 32P 193
- 3H 187
- 4,8-diMeIQX 140
- 4-aminobifenile 140, 141
- 4-MeIQ 140
- 4-nonilfenolo 188
- 4-NP vedi: 4-nonilfenolo
- 7,12-dimetil-benzo(a)antracene 217
- 8oxodG 93, 100
- A α C 140
- Aberrazioni
- cromosomiche 54, 57, 58
 - nucleari 58
- Acceptable Daily Intake 31

- Accrescimento
- fetale 70
 - ponderale 97
- Acetonitrile 147
- ACF 67, 68
- Acidi aloacetici 214
- Acidi ftalici vedi: Ftalati
- Acido ascorbico 133
- Acido colico 68
- Acido ditiocarbammico 153
- Acido nitroso 49
- Acido okadico 129
- Acido retinoico 12
- Acridine 49
- Addotto 23
- al DNA 24, 192
 - con ^{32}P 23
 - con aflatossina B1 128
- ADI vedi: Acceptable Daily Intake
- AE vedi: Ammine eterocicliche
- AFB1 vedi: Aflatossina B1
- Aflatossina B1 23, 56, 128, 129
- Agenti alchilanti 49, 50
- Agenti intercalanti 50
- Agranulocitosi 127
- AHH 21
- Albero filogenetico 9
- Albinismo 38
- Alchilazione dell'ossigeno 133
- Alchilfenoli 184
- Alchiltrasferasi 48
- Alcol 80
- tossico della placenta 81
- Aldicarb 155
- Aldrin 155, 164
- Alimentazione 13
- Aloaldeidi 214
- Alochetoni 214
- Alofenoli 214
- Alogeni 233
- Alogenuri di cianogeno 214
- Alopicrine 214
- Alterazioni dell'embriogenesi 70
- Alzheimer (morbo di) 91, 94, 95
- Amanita phalloides 125
- Amanitine 126
- Ameba 212
- Ames (test di) 55, 56, 59
- Amigdalina 125
- Amiloide-precursor protein 95
- Aminonaftalene 141
- Aminopirina 29
- Amital DL50 29
- Ammine aromatiche 140, 141, 148, 149
- Ammine eterocicliche 138, 139, 147
- Analoghi di basi 50
- Androgeni 13
- teratogenesi da - 74
- Anemia falciforme 38, 41
- Anencefalia 71

- Anfora da vino 200
- Anilina 29, 140, 141
- Animali da esperimento 5
- Anticolinesterasici 158, 159
- Antidetonanti 200
- Antiepilettici 76
- Antiossidanti 87
- Apc 61, 62
- Apolipoproteina E 95
- APP vedi: Amiloide-precursor protein
- Aragosta 11
- Aril idrocarbon idrossilasica vedi: AHH
- Armadillo 11
- Arsenico 147, 199, 203
- azione tossica dell' 203
 - metabolismo 203
 - pigmentazione da 204
 - tossico placentare 81
- As vedi: Arsenico
- Ascaris 212
- Aspergillus ochratus 127
- Aspirina (coefficiente di variazione) 16
- Atrazina 188
- Attivazione metabolica 57
- Autorizzazione di un nuovo medicinale 64
- Azione tossica dell'arsenico 203
- AZT 12
- B**(a)P dioloepossido 22
- B(a)P vedi: Benzo(a)pirene
- B(a)P-7 192
- B(j)F 194
- B(k)F 194
- Bacillus cereus 130
- Bambù 125
- Bardot, Brigitte 47
- Basso livello di igiene 231
- Baygon 159
- Benzene 109, 147, 154, 216, 226
- Benzidina 141
- Benzo(a)antracene 194, 196
- Benzo(a)pirene 22, 51, 192, 194, 196
- benzo(a)pirene equivalenti 196, 197
- Benzo(b)fluorantrene 194
- Benzo(b)pirene 192
- Benzo(e)pirene 194
- Benzo(g,h,i)perilene 194, 196
- Benzo(k)fluorantrene 194
- Benzofurani 171
- Beta-carotene 4, 86
- Beta-catenina 62
- Bifenili policlorurati vedi: PCB
- Biological Oxygen Demand (BOD) 212
- Biossido di azoto (NOx) 223, 232, 235
- Biossido di cloro 217
- Bisfenolo-A 185
- BMI vedi: Body Mass Index
- BOD vedi: Biological Oxygen Demand
- Body Mass Index 97, 98
- Bromato 214

- Bromodeossiuridina 49
- Bromodiclorometano 214
- Bromoformio 215
- Bromotriclorometano 85
- C**admio 199, 204
- Caffeina DL50 29
- Calzaturieri 109
- Campylobacter jejuni 130
- Cancerogeni alimentari 68
- Carbammati 153, 159
- Carbomonossiemoglobina (COHb) 224, 225
- Cariotipo 39
- Cassava 125
- Catena alimentare 131
- Catrame 143
- CCl4 29, 85
- Cd vedi: Cadmio
- Cellule Hela 57
- Ceppo TA100 128
- Chemical Oxygen Demand 212
- Cheratosi attinica 46, 47
- Chernobyl 44
- Chetoconazolo 184
- Chiocciola di mare 11
- Cianogeno 125
- Cicasina 125
- Ciclammati (coefficiente di variazione) 16
- Ciclodieni 154
- Cicloesani 154
- Ciclofosfamide 76
- Ciclofosfammide 12
- Cicutina 3
- Cirrosi epatica da alcol 91
- Citocromi P450 20
- Claviceps purpurea 127
- Cloracne 179, 180
- Cloralio idrato 214
- Cloramina 217
- Clorazione acqua 212, 215
- Clorfenirammina 137
- Clorofluorocarburi 233
- Cloroformio 215
- Clostridium perfringens 130
- CO 147
- concentrazioni ambientali 225
- limiti di legge 225
- Cocaina
- coefficiente di variazione 16
- tossico della placenta 81
- Coefficiente di variazione 15
- COHb vedi: Carbomonossiemoglobina
- Colinergico (sistema) 155
- Comet assay 90
- Composti organo-alogenati 215
- CoV vedi: Coefficiente di variazione
- Cr vedi: Cromo
- Creatina 138
- Crisene 194, 196
- Cromo 199, 204

- Cross-over 106
- Crysanthemum cinerarifolium 161
- Curva di Gauss 14
- Curva normale 14
- Curva-dose
- curva-dose risposta classica 3
 - curva-dose risposta individuale 4, 124
- Curve di sopravvivenza 97
- CYP1A1 21
- Cyp4502E1 133
- D**anno
- ischemico 90
 - ossidativo 90, 94
 - renale 127
- DBA vedi: Dibenzoantracene
- DDA 164, 165
- DDD 155
- DDE 164, 165
- DDE 186
- DDT 153, 155, 164, 165, 166, 167, 177, 184, 185
- negli alimenti 168
 - op-DDT 165, 185
 - policlorurati 171
- pp-DDT 165
- Decametrina 161
- DEHP vedi: Dietilexilftalato
- DEN 137
- Densità spermatica 78
- DES (teratogenesi da) 74
- Deviazione Standard 15
- Diabete mellito 90
- Diazinon 160
- Dibenzoantracene 191, 194
- Dibromoclorometano 215
- Dicloroacetato 214
- Diclorobromometano 215
- Diclorodifeniletani 154
- Diclorvos 160
- Dicumarolo (teratogenesi da) 74
- Dieldrin 165, 182, 184, 185
- Dieni coniugati 89
- Dietilexilftalato 187
- Dietilstilbestrolo (teratogenesi da) 74
- Difenidramina 137
- Difetti
- cardiovascolari 72
 - congeniti 70, 72
- Dimeri di timina 46
- Dimetilammioazobenzene 19
- Dimetilbenzantracene 99
- Dimetilidrazina 68
- Dimetoato 155, 159, 160
- Diossido di zolfo 235
- Diossina (incidente del 1999) 176
- Diossine 182
- Disabili (numero in Toscana) 121
- Diserbante 2,4,5-T 179
- Diserbante 2-4-D 179
- Distillazione planetaria 169

- Disulfoton 160
- DL50 27
- convenzionale 30
 - in specie diverse 29
 - approssimata 28, 30
 - nei mammiferi 162
- DMBA vedi: Dimetilbenzantracene
- DMH vedi: Dimetilidrazina
- DMN 137
- DNA
- mitocondriale 86
 - errori nel - 53, 54
 - riparazione del danno 54
- Dose letale 50 vedi: DL50
- Dose letale approssimata 30
- Double strand breaks 37
- Doxorubicina 84
- DSBs vedi: Double strand breaks
- Ecosistema 130
- Eisena foetida 33
- Elettrofilo 19
- Embrioni di ratto 76
- Eme 20
- Emivita 13
- Emofilia 38
- Endonucleasi 48
- Endosulfano 169
- Endosulphan 184, 185
- Entamoeba histolytica 211
- Environmental pollution 34
- Enzima fotoriattivante (PRE) 48
- Enzimi antiossidanti 89
- EPA 182
- Epidemiologia 104
- EPR 88
- Erbicidi
- bipiridinici 84
 - triazinici 189
- Errori nel DNA 53, 54
- Escissione di nucleotidi 48
- Esonucleasi 48
- ESR 88
- Estradiolo 184
- Estratti polifenolici 66
- Estrogen
- receptor 184
 - responsive element 184
- E**strogeni
- ambientali 184
 - effetti sul maschio 184
 - effetti sulle femmine 185
 - marcati 187
- Estrone 186
- Etanolo (teratogenesi da) 81
- Etenoadotti 87
- Etilmetansulfonato 50
- F**aloidina 126
- Fenilchetonuria 38

- Fenoli 133
- Fenossiacidi 153
- Fenvarelato 161
- Feto (maturazione del) 73
- FGF 61
- Fibra parasimpatica periferica 155
- Fibrosi cistica 38
- Filtro di carbone attivo 216
- Finasteride 184
- Flunitrazepam 16
- Foci di cripte aberranti vedi: ACF
- Focomelia 71
- Food and Drug Administration 26
- Formaldeide 49, 147
- Fos 61
- Fotocarcinogenesi 47
- Fotodecomposizione 195
- Fotoinvecchiamento 46
- Ftalati 186, 187
- Fugu 28, 129
- Fumatori (stimati in Italia) 146
- Fumo di sigaretta 112
 - livello di tossicità per la placenta 81
 - patologie legate al 91
 - stima del consumo 145
- Fusarium 127
- G**eni oncosoppressori 61
- Giardia lamblia 211, 212
- Giemsa 58
- Gip-2 61
- Glicole
 - dietilenico 12
 - etilenico 26
- Glicosilasi 48
- Glutazione perossidasi 87
- Granulociti 86
- GRPR 148
- H**CB 165, 169, 177
- HCH 165
 - α -HCH 165
 - β -HCH 165
 - γ -HCH 165
- HCN 125
- Hg vedi: Mercurio
- Hiroshima 43, 44
 - bomba di 42
- hMLH1 61
- Hookworm 212
- HPLC 89
- I**cmesa 179
- Idrocarburi alogenati 85
 - non metanici 230
 - poli ciclici aromatici 191
 - volatili 89
- Idrocefalo 71
- Idrossilamine 49
- IGF 100

Incidente diossina del 1999 vedi: Diossina

Induttore 21

Infarto miocardico 117

mortalità 120

Inibitori enzimatici 126

Inquinamento dell'aria 220

Insetticidi anticolinesterasici 159

Intossicazione da arsenico 204

da PCB e TCDD 178

Invecchiamento 93, 94

IPA 191

cancerogeni 147

livelli aerei medi 195

Ipospadias 71

Ippocrate 199

IQ 139, 140

Irradiazione 90

Isotiocianato 126

Laringe maschile 189

Latte materno 176

Lectine 126

Leucemia 107, 109, 147

Ligasi 48

Linamarina 125

Lindano DL50 29

Lipidi corporei 14

Lipofuscine 89

Lipoproteine ossidate 91

LOAEL 31

Locus Ah 193

Lombrichi 33

Lustig 104

Macrofagi 86

Malaria (in Toscana) 121

Malathion 155

Malattie

autoimmuni 90

cardiovascolari 111

infatili 234

Malformazioni

malformazioni in Toscana 72

malformazioni spontanee 70

Marcatore biologico 106

Marmotta 11

MDA 89

MDF 67, 68

MeA α C 140

MeIQ 139

MeIQX 140

Melanoma 47, 48

Menarca 185

Mercurio 199, 205

emissioni di 206

nel pesce 207

teratogenesi 75

tossico della placenta 81

Metadone (coefficiente di variazione) 16

Metalli pesanti 199, 206

Metalloproteinasasi (MP) 150
 Metanolo 147
 Metilazione del DNA 134
 Metilbenzene 216
 Metilmercurio (teratogenesi da) 75
 Metodo up and down (DL50) 30
 Metotrexato 76
 Metoxyxhlor 184
 Micotossine 127
 Microcefalia 71
 Mielomeningocele 71
 Mieloperossidasi 86
 Migrazioni 8
 Miller, James e Elizabeth 19
 Minamata (sindrome di) 205
 Mirex 177
 Mobam 155
 Monossido di carbonio 223
 Monossigenasi 21
 Morbo di Alzheimer 94, 95
 Morbo di Down 40
 Mortalità
 cause principali 117, 118
 in Italia 114
 per incidenti 118
 per tumori 147
 per tumori in Toscana 119
 prenatale 173
 MP vedi: Metalloproteinasasi
 Mutanti 37

Mutazioni
 cromosomiche 39, 40
 di ritorno 55
 geniche 40, 41
 genomiche 40
 MX: 3-cloro-4-(diclorometil)-5-idrossi-2-(H)-furanone 214
 Myc 61

NADPH ossidasi 90

Naftilammine 140
 Nagasaki 43, 44
 N-dialchilnitrosammine 133
 Nefropatia *acuta 202 *cronica 202
 Neu 61
 Neurone colinergico 155
 Nicotina 143, 147, 154
 Nitriti 136 - nei cibi 136
 Nitrofurantoina 84
 Nitrosammidi 133
 Nitrosammine 133, 137, 147
 N-Nitroso composti 134, 135 - nella dieta 136
 N-nitrosobutilmetilammina 134
 N-nitrosoderivati 133
 N-nitrosodibutilammina 134
 N-nitrosodietilammina 134
 N-nitrosodimetilammina 134
 N-nitrosoetilmetilammina 134
 N-nitrosornicotina 134
 N-nitrosopiperidina 134
 N-nitrosopirrolidina 134

N-nitrosopropilammina 134

NNK 135

NO₂ 137

NOAEL 31

Noccioli di mandorla 125

NO_x vedi: Biossido di azoto

NPIP 137

NPYR 137

Nucleofili (gruppi) 19

Nutrizione (disturbi della) 101

O,m,p-toluidine 140

Obesità 100, 101

Obeso vedi: obesità

Ocratossine 127

octaCDD 177

octaCDF 177

Olio di soia 166

Oncogeni 61

Oncosoppressori (geni) 61

Onde elettromagnetiche 107

Organoclorurati 154, 168, 182

Organofosforici 155, 159

Orso polare 4

Ossidasi

 a funzione mista 21

 flaviniche 83

Ossidi 223, 232, 235

 di carbonio 235

 di ozono 235

 di zolfo 221

Ossigeno

 alchilazione dell' 133

 singoletto 85

 consumo di 93

Ovociti 80

Ozonazione 212, 215

Ozono 217, 228, 229, 230, 233

P 450 21

P53 61

PAH 22

 cancerogeni 147

Palatoschisi 71

Papiro di Ebers 2

Paracelso 2

Paracetamolo 85

Paradosso francese 92

Parathion 155, 159, 160

Parkinson 91

 da pesticidi 162

Particolato 195, 227, 228

Pb vedi: Piombo

PBB 171, 173

PBDD 171

PBDF 171

PCB 13, 131, 165, 171, 172, 177, 178, 180, 181, 182, 185, 206

PCDD 171, 172, 173, 176, 177, 178, 179, 185

PCDF 171, 172, 173, 176, 177, 178

Pectenotossine 129

- Pellagra 124
- Penta CDD 176
- Penta CDF 176
- Percival Pott 191
- Permetrina 161
- Perossidazione lipidica 87, 89
- Pesce
- cantonese 135
 - concentrazione di mercurio 207
- Peso corporeo 97
- Pesticidi "alternativi" vedi: Piretroidi
- Pesticidi 152 *consumo in Italia 155
- P-fenilendiammina 26
- PhIP 139, 140
- Photoageing 46
- Pigmentazione da arsenico 204
- Piombo 147, 200
- Pirene 196
- Piretrine 161
- Piretro 161
- Piretroidi 161
- Piridina 147
- Piroxicam 68
- Placca ateromatosa 91, 92
- Placebo 106
- Plastica 186
- Polidattilia 71
- Polifenoli 93
- del vino 92
- Polimerasi 48
- Polimorfismo m2 21
- Poliposi familiare del colon 38
- Popolazione mondiale 80
- Popolazioni appaiate 106
- ppm 220
- Proantocianidine 92
- PROBIT 27, 28
- Prodotti bromurati 215
- Proflavina 49
- Promotori 66
- Promozione 66
- Propoxur vedi: Baygon 159
- R**adicali liberi 83, 88, 90
- Radioattività 44
- Raggi X 42
- Ras 61
- Ratti
- embrioni di 76
 - F344 63
- Reactive Oxygen Species (ROS) 83
- Reattività differenziale dei VOCS 228
- Reazione di FENTON 83, 87
- Recettore Ah 175
- Recettore dopaminergico Drd2 A1 143
- Recettore muscarinico (bloccante: atropina) 155, 159
- Recettore nicotinico 155
- gangliare 159
- Relazione dose-risposta 64
- Restrizione calorica 99

- Ret 61
- Retinoblastoma 38
- Retinoide 73
- Retinolo 4
- Ricoveri ospedalieri 231, 233
- Riparazione del danno al DNA 54
- Riperfusione 90
- Rischio Relativo 107
- Rotavirus 211
- Rotenone 154, 162
- RR vedi: Rischio Relativo
- S9 56

- S**almone 182
- Salmonella 130
- Salmonella typhimurium 55, 128, 138, 215
- Saxitossina 129
- Scambi tra cromatidi fratelli 54, 58
- Scavenger 86, 89
- SCE 58, 59
- Seveso 180
- Shigella 130
- Sigaretta vedi: Fumo di sigaretta
- Sindrome di Down 38
- Sindrome di Minamata 205
- Sindrome fetotalcolica 81
- Sindromi da iperossigenazione 90
- Single strand breaks 36
- Sis 61
- Sister chromatide exchange 58, 59
- Skin ageing 150
- Smog 221
- SMR vedi: Standardized Mortality Ratio
- Soggetti sovrappeso vedi: obesità
- Sorgenti di inquinamento
 - diffuso 212
 - puntiforme 212
- Sostanze estrogeniche vedi: Estrogeni
- SOx 221, 222
- Speranza di vita 114
 - in Toscana 121
- Sperma 79
 - densità dello 184
- Spessore delle uova 166
- Spettro eritemigeno 45
- Spiazzamento di estrogeni marcati 187
- Spin trap 88
- Src 61
- SSB 36
- Stafilococcus aureus 130
- Standardized Mortality Ratio 109
- Sterilità maschile 185
- Stirene 147
- Strato d'ozono 233
- Streptococco gruppo A 130
- Streptomicina (teratogenesi da) 74
- Struttura dell'età 116
- Studi casi-controllo 111
- Studi geografici 106
- Studio di coorte 110, prospettico 108

- Suore americane 95
- Superossido 84
- Superossido dismutasi 87, 93
- Sviluppo multi-step di un tumore 67
- T**abacco 143
- Talidomide 12, 26, 76
- teratogenesi da 75
- TCDD 13, 173, 174, 175, 176, 178, 180, 181
- TCDD-Equivalenti 176
- Teofrasto di Erebo 199
- Terapia dell'intossicazione da arsenico 204
- Terreno inglese 177
- Test di Ames 55, 56, 59
- Test di citogenetica 'in vitro' 59
- Test di citogenetica 'in vivo' 59
- Test di mutagenesi 53, 54
- Test Salmonella-microsomi 55
- Testicolo 79
- Testosterone ematico 189
- Tetano in Toscana 120
- TetraCDD totali 176
- TetraCDF totali 176
- Tetracloruro 85
- Tetrodotossina 28, 129
- Topi Ahr-/- 174
- Topi B6C3FI 63
- Topi ob/ob 12
- TOSCA 32
- Tossicodipendenza da nicotina 143
- Tossificazione 83
- Tossina botulinica 29
- Toxafene 182, 184
- Trattamento con cloro vedi: Clorazione acqua
- Trial randomizzati 105
- Trialometani 214
- Tribromometano 214, 216
- Tributiltin 186
- Tricloroetilene 85
- Triclorofenolo 214
- Triclorometano 214
- Tricoteceni 127
- Trp-P-1 140
- Tubulo seminifero 79
- Tumore del colon 117, 140
- Tumore del fegato 167
- Tumore del polmone 112, 115, 116, 117, 147, 234
- incidenza in Toscana 120, 146
 - incidenza in Italia 148
- Tumore del testicolo 78, 185
- Tumore della mammella
- incidenza in Toscana 120
- Tumore della tiroide 45
- Tumore della vescica 141
- Tumore dell'intestino 139
- Tumore dello stomaco 117
- incidenza in Toscana 120
- Tumori 147
- nell'aria di Seveso (tipi di) 180
- Tumori del sangue 110

Uova (spessore delle e DDT) 166

UV 45, 46, 232

Va vedi: Vanadio

Valori approssimativi di DL50 28

Vanadio 199

Variabilità genetica 9

VI emendamento 32

Vietnam 179

Vigore degli ibridi 17

Vinclozolin 184, 186

Vitamina A 4, 93

Vitamina C 86, 93

Vitamina E 86, 93

Xantina ossidasi 90

Xenobiotici 21

Xeroderma pigmentosum 49

Yam 125

Yersinia enterocolitica 130

Zectran 155, 159