

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**Oncologia e Patologia Sperimentale**

Progetto 1: Oncologia

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/A2

Settore Scientifico-Disciplinare di appartenenza: MED/04

**ANALISI DEL PROFILO TOSSICOLOGICO E  
CANCEROGENO DEL PARTICOLATO  
ATMOSFERICO E IDENTIFICAZIONE DEI RISCHI  
PER LA SALUTE UMANA CORRELATI  
ALL'ESPOSIZIONE**

Tesi di dottorato di ricerca presentata da:

**Dott.ssa Angela Guerrini**

Coordinatore Dottorato

**Chiar.mo Prof. Sandro Grilli**

Relatore

**Chiar.mo Prof. Sandro Grilli**

**Esame finale anno 2012**

# Indice

---

<b>Introduzione e Scopo della Tesi</b>	<b>1</b>
<b>Capitolo 1: Cancro e cancerogenesi</b>	
1.1 Caratteristiche generali del cancro	6
1.2 Cancerogenesi chimica	9
<b>Capitolo 2: I test alternativi</b>	
2.1 Il saggio di cancerogenesi <i>in vivo</i> e i test alternativi	17
2.2 Il test di trasformazione cellulare	21
2.2.1 Il modello di trasformazione BALB/c 3T3	23
2.3 Tossicogenomica: la trascrittomica	26
<b>Capitolo 3: Il <i>Risk Assessment</i></b>	
3.1 Valutazione dell'evidenza di cancerogenicità	30
3.2 Valutazione del rischio	33
3.3 Stima del rischio cancerogeno da esposizioni ambientali	37
<b>Capitolo 4: Il particolato atmosferico</b>	
4.1 Caratteristiche generali del Particolato Atmosferico	44
4.2 Origine del Particolato Atmosferico	46
4.3 Composizione chimica del PM	49
4.4 Effetti del Particolato Atmosferico	51

4.5	Effetti del PM sulla salute umana	52
4.5.1	Tossicità del particolato	61
4.5.2	Evidenze epidemiologiche	63

## **Capitolo 5: Materiali e Metodi**

5.1	Campionamenti di PM	74
5.2	Colture cellulari	76
5.3	Preparazione dei campioni per lo studio tossicologico	77
5.4	Test di citotossicità	79
5.5	Test di trasformazione	81
5.5.1	Stima dell'attività trasformante	82
5.5.2	Criteri di accettabilità del test e di classificazione dei campioni	83
5.5.3	Analisi statistica	84
5.6	Analisi trascrizionale	87
5.6.1	Estrazione, purificazione, quantificazione e controllo qualità dell'RNA	87
5.6.2	Marcatura RNA e ibridazione microarray	89
5.6.3	Lettura allo scanner e analisi dati	91
5.6.4	Interpretazione biologica	92
5.7	Valutazione del rischio cancerogeno	93

## **Capitolo 6: Risultati**

6.1	Test di trasformazione	95
-----	------------------------	----

6.1.1	Risultati preliminari	95
6.1.2	Campagna estiva	102
6.1.3	Campagna invernale	106
6.2	Analisi trascrizionale	115
6.2.1	Disegno sperimentale	115
6.2.2	Riproducibilità tecnica	117
6.2.3	Analisi statistica	118
6.2.4	Interpretazione biologica: campagna invernale	122
6.3	Valutazione del rischio cancerogeno	126
6.3.1	Campagna estiva	126
6.3.2	Campagna invernale	138
<b>Capitolo 7: Conclusioni e Discussione</b>		<b>148</b>
<b>Bibliografia</b>		<b>167</b>
<b>Pubblicazioni, abstract e partecipazioni a congressi della Dott.ssa Angela Guerrini</b>		<b>188</b>

## Introduzione e Scopo della Tesi

Il cancro rappresenta la seconda causa di morte nel mondo occidentale, dopo le patologie cardiovascolari (Ferlay *et al.*, 2010). Nonostante i continui progressi compiuti nel campo della diagnostica, nella comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari della patologia neoplastica, la prognosi di molti tumori e i tassi di mortalità ad essi associati sono rimasti pressoché invariati nell'arco degli ultimi trent'anni.

La cancerogenesi è un processo complesso, multifasico e multifattoriale, che può essere influenzato da fattori endogeni (es. predisposizione genetica, danni al sistema immunitario e infiammazioni croniche) e da numerosi fattori esogeni o ambientali quali le abitudini alimentari, lo stile di vita, i virus, le radiazioni e l'esposizione ad agenti chimici.

Ci sono evidenze consistenti che associano l'inquinamento atmosferico con una serie di effetti sulla salute, tra cui l'aumento dell'incidenza e della mortalità per patologie cardiovascolari e respiratorie. Inoltre è noto che l'esposizione a lungo termine alle emissioni dalle maggiori fonti di combustione, sia fisse che mobili, di Particolato Atmosferico (PM), una miscela complessa ed eterogenea di sostanze organiche ed inorganiche, influenza non solo *endpoint* come la morte prematura ma contribuisce anche all'insorgenza ed alla progressione di patologie cliniche e subcliniche di vario tipo, tra cui le patologie tumorali (Pope *et al.*, 2006; WHO, 2006; Krzyzanowski *et al.*, 2008; Forastiere, 2002).

Sulle emissioni del PM in aree fortemente antropizzate è rilevante l'effetto del traffico veicolare, la presenza di impianti

per la produzione di energia, di riscaldamento domestico e di termovalorizzatori (Maguhn *et al.*, 2003).

Il tema dello smaltimento dei rifiuti è critico nelle società avanzate, caratterizzate da consumi elevati e produzioni crescenti e pone numerosi problemi di natura tossicologica, ecologica e di compatibilità con lo sviluppo del territorio.

La motivazione a impostare uno studio sugli aspetti ambientali e sanitari nelle aree circostanti gli inceneritori presenti sul territorio regionale nasce dalla consapevolezza di questa centralità e criticità, insieme con la considerazione che sono ancora inadeguate le evidenze relative agli effetti sulla salute degli impianti di incenerimento rifiuti, così come non sono ancora esaustive le informazioni relative a qualità e quantità delle sostanze emesse.

Gli approcci tradizionali nel monitoraggio ambientale e nella caratterizzazione del rischio associato si basano sulla determinazione chimica di un set di contaminanti prioritari, selezionati a partire dai dati tossicologici relativi a effetti legati alla esposizione alle alte dosi. I campioni di origine ambientale sono caratterizzati dalla presenza simultanea, a livelli molto bassi, di numerosi contaminanti eterogenei, presenti in concentrazioni accettabili a norma di legge. I lavori condotti negli anni '90 sugli effetti degli inceneritori hanno messo in evidenza le emissioni di composti nocivi quali idrocarburi policiclici aromatici (IPA), idrocarburi policiclici aromatici nitrati (NIPA), diossine, furani e policlorodifenili (PCB), oltre a metalli pesanti, in quantità significative.

La stima degli effetti tossici e cancerogeni di miscele complesse di origine ambientale, basata sull'analisi dei singoli componenti, può condurre a una sottovalutazione delle potenziali

interazioni tra le molecole presenti nella miscela a dosi inferiori alla soglia di efficacia.

L'utilizzo di modelli sperimentali *in vitro* sensibili e predittivi permette una stima dell'attività biologica complessiva del campione ambientale. Questo approccio consente di analizzare miscele reali estratte da diverse matrici ambientali, di valutare le relazioni dose-risposta e di identificare marcatori biomolecolari direttamente correlati con l'esposizione. Tutto ciò, oltre a permettere di delineare un profilo tossicologico della miscela e a descriverne le interazioni tra le diverse componenti, rende più attendibile la stima del rischio per la salute umana, quando non siano disponibili dati di evidenze epidemiologiche.

Il modello cellulare utilizzato, rappresentato dalla linea cellulare di fibroblasti murini BALB/c 3T3, costituisce un modello di riferimento per lo screening dei cancerogeni ambientali, anche di quelli con meccanismo d'azione epigenetico (promovente).

Tra i test alternativi di cancerogenesi, il test di trasformazione *in vitro* su cellule BALB/c 3T3 rappresenta il modello sperimentale più accreditato (OECD, 2007; Lilienblum *et al.*, 2008) e già ampiamente utilizzato per la valutazione del potenziale cancerogeno di composti sia genotossici che non genotossici e che presentano particolari caratteristiche strutturali predittive di cancerogenicità.

Sebbene esistano in letteratura numerosi e recenti lavori sperimentali che descrivono gli effetti acuti e cronici dell'esposizione ad inquinanti ambientali e, in particolare, al particolato fine, sono carenti studi il cui disegno sperimentale sia in grado di offrire una visione organica dell'entità e qualità dei possibili danni indotti, di individuare biomarcatori in grado di

predire, con un buon margine di certezza, il rischio per l'uomo e di consentire la stima di una relazione diretta tra l'esposizione attuale e i possibili effetti futuri.

Recentemente lo studio delle interazioni gene-ambiente ha posto l'accento sull'importanza dell'individuazione di biomarcatori specifici di esposizione, effetto, rischio e suscettibilità, nella determinazione dei meccanismi d'azione di miscele ambientali, per definirne la reale pericolosità ed effettuare stime accurate del rischio.

L'applicazione delle tecnologie tossicogenomiche, con particolare riferimento alla trascrittomica, costituisce uno strumento prezioso per approfondire l'effetto tossicologico di contaminanti ambientali presenti sotto forma di molecole singole o miscele complesse. Questo tipo di approccio consente di definire i profili di espressione genica che sottendono a risposte biologiche complesse nell'intento di individuare biomarcatori in grado di predire il rischio per l'uomo, e di consentire la stima di una relazione diretta tra l'esposizione e i possibili effetti.

Obiettivo della tesi è la valutazione mediante due approcci *in vitro*, test di trasformazione cellulare e analisi trascrizionale, della qualità dell'aria in prossimità dell'inceneritore di Bologna, confrontata con l'area urbana e rurale, in relazione all'induzione di effetti tossici e di cancerogenesi indotti dal particolato, e la valutazione della variazione del rischio cancerogeno attuale indotto dalla composizione dell'aria prossima all'inceneritore rispetto alle aree adiacenti.

Tale valutazione del rischio riguarderà l'impiego di metodi a soglia e probabilistici a seconda delle patologie/effetti



tossici considerati e sarà eseguita a partire dai dati delle caratterizzazioni chimiche di PM, IPA, NIPA, diossine e PCB relativi ai campionamenti d'aria in siti di monitoraggio diversamente interessati dall'impatto delle emissioni del termovalorizzatore.

# CAPITOLO 1

## Cancro e cancerogenesi chimica

### 1.1 Caratteristiche generali del cancro

Nel mondo occidentale il cancro rappresenta la seconda causa di morte dopo le malattie cardiovascolari. *L'International Agency for Research on Cancer (IARC)* ha stimato che nell'anno 2008 le morti provocate dal cancro sono state 1.7 milioni, con 3.2 milioni di nuovi casi (Ferlay *et al.*, 2010). Il cancro, dunque, continua ad essere una delle maggiori cause di morte nonostante i continui progressi compiuti nel campo della diagnostica, nella comprensione dei meccanismi cellulari e molecolari della patologia neoplastica e conseguentemente nella chemioterapia.

Il cancro è un disordine iperproliferativo e aggressivo che evolve nella trasformazione cellulare, disregolazione dell'apoptosi, angiogenesi e, se non è individuato ad uno stadio precoce, può invadere e metastatizzare altri organi dell'organismo. La neoplasia è una massa anomala di tessuto la cui crescita è eccessiva e scoordinata rispetto a quella del tessuto sano anche dopo la cessazione degli stimoli che hanno evocato l'alterazione; si comporta in modo afinalistico, cresce a spese dell'ospite ed è autonoma. La crescita del tessuto neoplastico è devastante per l'ospite in quanto compete con le cellule ed i tessuti sani per gli apporti energetici e il substrato nutritivo (Willis *et al.*, 1952).

Tutti i tumori, sia benigni sia maligni, hanno due componenti basilari: le cellule neoplastiche proliferanti che costituiscono il *parenchima* e lo *stroma di supporto*, costituito da

tessuto connettivo e da vasi sanguigni. Le cellule parenchimali, sebbene costituiscano la porzione proliferante della neoplasia e ne determinino pertanto la natura, la crescita e l'evoluzione, dipendono in maniera critica dal loro stroma. È importante che vi sia un apporto adeguato di sangue e che il tessuto connettivo stromale fornisca l'intelaiatura che sostiene le cellule parenchimali.

Nella maggior parte dei casi la distinzione tra tumore maligno e benigno può essere fatta con considerevole sicurezza su base morfologica; talvolta, la classificazione di un tumore è resa difficile da una marcata discrepanza tra l'aspetto morfologico di un tumore ed il suo comportamento biologico. Per questi motivi sussistono dei criteri per poter distinguere le due differenti forme tumorali:

- ✓ **Differenziazione e anaplasia.** La prima si riferisce al grado di somiglianza tra cellule parenchimali neoplastiche e normali, dal punto di vista sia morfologico che funzionale. In generale, tutti i tumori benigni sono ben differenziati, viceversa, nell'ambito delle neoplasie maligne, esistono sia forme ben differenziate che indifferenziate. Le neoplasie maligne costituite da cellule indifferenziate, sono definite anaplastiche. Pertanto, la mancanza di differenziazione o anaplasia, costituisce un carattere distintivo, indice di trasformazione maligna.
- ✓ **Velocità di accrescimento.** Essa è correlata con il livello di differenziazione del tumore e, pertanto, la maggior parte delle forme maligne si accresce più rapidamente di quelle benigne.
- ✓ **Incapsulamento e invasività.** Quasi tutti i tumori benigni si accrescono come masse espansive e coesive, che rimangono

localizzate nel sito di origine e non hanno la capacità di infiltrare o invadere siti anche distanti da quello di provenienza; essi sviluppano un rivestimento di tessuto connettivale chiamato capsula fibrosa, che li separa dal tessuto dell'ospite. Quelli maligni, invece, crescono con una infiltrazione progressiva invadendo e distruggendo il tessuto circostante.

- ✓ **Metastasi.** Con poche eccezioni, tutti i tumori maligni possono metastatizzare. Le metastasi sono impianti tumorali discontinui rispetto al tumore primario e rivelano la natura maligna di una neoplasia.

I fattori implicati nella cancerogenesi possono dividersi in estrinseci, cioè fattori ambientali (virus, radiazioni, prodotti chimici, dieta, ecc.), ed intrinseci o genetici, correlati con l'età o fisiologici (stato immunitario, equilibrio endocrino). I fattori ambientali interagiscono con quelli intrinseci ma anche più fattori ambientali od intrinseci possono tra loro influenzarsi. Inoltre, uno stesso tumore può essere indotto da fattori diversi ed uno stesso fattore può provocare tumori diversi. Gli agenti capaci di trasformare le cellule *in vitro* e di produrre tumori negli animali da esperimento sono molto numerosi. Essi vengono comunemente suddivisi nelle seguenti categorie:

- a.** radiazioni;
- b.** agenti biologici tra cui spiccano i virus oncogeni;
- c.** cancerogeni chimici.

Le radiazioni ed alcuni cancerogeni chimici sono cause ormai ben documentate di tumori nell'uomo; in alcune forme di

neoplasia diventa sempre più evidente un'eziologia di tipo virale (Robbins, 2000).

## 1.2 Cancerogenesi chimica

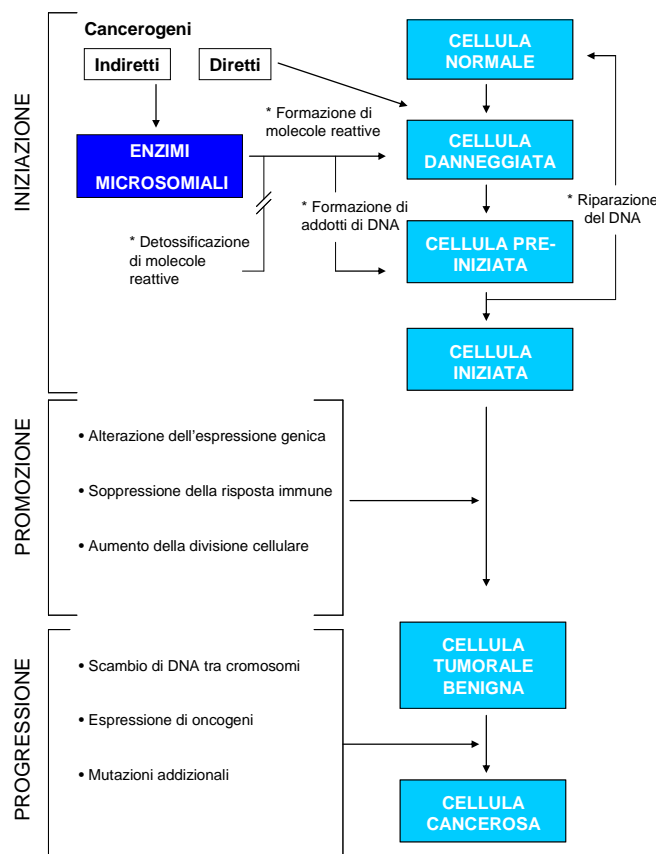
I cancerogeni chimici provocano, come loro specifico effetto avverso, la comparsa di cancro negli animali e nell'uomo. La risposta ai cancerogeni chimici varia con il variare della specie, del ceppo, e del sesso degli animali di esperimento.

Sebbene John Hill nel 1775 per primo avesse richiamato l'attenzione sulla correlazione esistente tra un "uso smodato di tabacco" e alcuni polipi alla mucosa nasale e a livello faringeo, è soprattutto a Sir Percivall Pott, sempre nel 1775, che dobbiamo le prime acquisizioni sulla potenziale cancerogenicità di alcune sostanze chimiche. Pott correlò l'alta incidenza di cancro dello scroto negli spazzacamini con l'esposizione cronica alla fuliggine (Pott, 1775).

La neoplasia rappresenta il risultato finale di un processo multifattoriale e multifasico, denominato **cancerogenesi**, che si traduce in una grave alterazione dell'omeostasi cellulare e tissutale. È ormai acquisito che la trasformazione neoplastica è causata da più eventi genetici sopravvenienti (mutazione, delezione, traslocazione) che si accumulano nel DNA cellulare, causando, alla fine, la perdita del controllo fisiologico della replicazione cellulare; il che si traduce, in genere, in un aumentato tasso di proliferazione cellulare, nell'aumentata sopravvivenza cellulare dovuta all'inibizione del processo fisiologico della morte programmata o apoptosi; e nel blocco del programma di senescenza cellulare con una persistente attivazione dell'attività telomerasica (Carbone *et al.*, 2004).

Il concetto di cancerogenesi inteso come processo multifasico suggerisce che il cancro si generi in seguito all'accumulo di mutazioni somatiche in una singola cellula in un determinato periodo di tempo e si manifesti in variazioni fenotipiche, da una cellula sana in una cellula pre-neoplastica, e progredisca nella neoplasia. I tumori indotti chimicamente sono caratterizzati da lunghissimi tempi d'insorgenza, nell'uomo il tumore si sviluppa anche a distanza di decine di anni dopo l'esposizione al cancerogeno.

Il processo di cancerogenesi chimica è generalmente suddiviso in tre stadi (**Fig.1.1**): iniziazione, promozione e progressione.



**Figura 1.1: Fasi della cancerogenesi ed eventi principali.**

L'**iniziazione** è un processo rapido e irreversibile in cui l'esposizione ad un agente cancerogeno genotossico, di natura chimica, conduce ad un danno cromosomico o a mutazioni genetiche non letali. Una cellula iniziata rimane perennemente alterata ed è probabile che essa dia origine ad un tumore, ma tale iniziazione, da sola, non è sufficiente alla formazione di un tumore.

Tutti i cancerogeni mutageni hanno una proprietà in comune: sono altamente elettrofili, possiedono atomi elettron-deficienti, e possono reagire con componenti cellulari nucleofili. I reagenti elettrofili possono attaccare diversi siti tra cui DNA, RNA e proteine (Robbins, 2000). L'interazione tra l'agente cancerogeno e il DNA non è del tutto casuale ed ogni classe di sostanze tende a produrre un determinato tipo di danno imprimendo una sorta di "impronta digitale" molecolare.

Nelle diverse basi azotate esistono gruppi chimici particolarmente vulnerabili all'azione degli agenti iniziatori, corrispondenti alle zone di parziale carica negativa del DNA. L'interazione dell'agente iniziante determina modificazioni strutturali delle basi azotate che possono determinare distorsioni della doppia elica e appaiamenti errati nel corso della duplicazione del filamento.

Le sostanze cancerogene iniziatori sono distinte in due categorie:

- I cancerogeni diretti sono in grado di interagire direttamente con il DNA e di essere rapidamente eliminati dagli apparati escretori. Sono caratterizzati da una spiccata idrofilicità determinata dalle numerose cariche elettriche superficiali, elettrofilicità e da capacità mutagene.

- I cancerogeni indiretti o precancerogeni, invece, a causa della loro struttura chimica, non possono interagire direttamente con il DNA ma richiedono una conversione metabolica *in vivo* per dare origini a molecole terminali capaci di trasformare le cellule. Sono quindi delle molecole neutre, idrofobe e lipofile (Guengerich, 1985).

Tali cancerogeni, una volta assorbiti, vengono veicolati ad organi preposti alla modificazione di sostanze esogene per renderle compatibili con i meccanismi di escrezione. Gli organi principalmente interessati a queste trasformazioni sono il fegato e la vescica. In queste sedi i precancerogeni si accumulano e vengono modificati in modo da essere resi idrosolubili. Automaticamente, in questo modo, acquisiscono anche la capacità di interagire con il DNA delle stesse cellule che ne hanno mediato la trasformazione.

La loro conversione metabolica è realizzata dagli enzimi di fase I, II, e III del *drug metabolism*. Il potere cancerogeno di una sostanza chimica è determinato non solo dalla reattività intrinseca del suo derivato elettrofilo, ma anche dall'equilibrio tra attivazione metabolica e reazioni di inattivazione (Guengerich, 2001).

Affinché si sviluppi il cancro è necessario che le mutazioni interessino geni importanti per il funzionamento della cellula stessa (Hanahan *et al.*, 2000). Essi sono:

- **Geni oncosoppressori**, molecole che controllano negativamente la proliferazione cellulare. I due geni oncosoppressori più noti sono quelli che codificano la proteina 53 (p53) e la proteina Rb. La p53 è un fattore cellulare che inibisce la progressione verso la fase S del ciclo cellulare mantenendo la cellula in fase G1, regolando la



sopravvivenza e la differenziazione. A differenza di molti geni oncosoppressori che si comportano da recessivi, p53 si comporta come gene dominante. Infatti mutazioni che interessano anche solo uno dei due alleli del gene p53 (condizione di eterozigosi) possono compromettere la funzionalità della proteina rendendola inattiva alla dimerizzazione funzionale. La proteina Rb è regolata dalla fosforilazione; nelle cellule quiescenti Rb si trova nella forma ipofosforilata che rappresenta la forma attiva della molecola che si lega al fattore di trascrizione E2F-1, inattivandolo. Nelle cellule in fase G1, Rb viene fosforilata inibendo così il legame con E2F-1.

- **Oncogeni**, sono gli elementi chiave dei processi di proliferazione, di sopravvivenza, di crescita e di differenziamento cellulare. Derivano dai proto-oncogeni, geni che promuovono la crescita cellulare in diversi modi. Tra i loro prodotti, si riconoscono molecole di diverse classi funzionali come fattori di crescita, recettori specifici per fattori di crescita, messaggeri secondari e fattori di trascrizione necessari all'attacco dell'RNA-polimerasi sul promotore del gene relativo. Mutazioni nei proto-oncogeni possono modificare la loro funzione, aumentando la quantità o l'attività delle proteine prodotte. Quando questo accade diventano oncogeni e le cellule hanno una maggiore probabilità di dividersi in maniera eccessiva e incontrollata. I promotori degli oncogeni agiscono a cascata: i fattori di crescita, legandosi agli specifici recettori presenti sulla membrana cellulare, innescano dei messaggeri secondari che finiscono con l'attivare una serie di fattori trascrizionali che consentono l'avvio della trascrizione dei geni cellulari.

- **Geni apoptotici**, che presiedono, cioè, la morte cellulare programmata. Questo processo è attuato dalla cellula in condizioni fisiologiche per controllare gli effetti dell'eccessiva proliferazione cellulare (Carbone *et al.*, 2004; Tsao *et al.*, 2004).
- **Geni che regolano la riparazione del DNA**, come il complesso del *Mismatch repair* (MMR). È un sistema di riparazione che gioca un ruolo critico nel controllo dell'integrità del genoma in tutti gli organismi dai batteri agli uomini. Negli eucarioti il sistema del *mismatch repair* mostra la presenza di due differenti complessi proteici eterodimerici: MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$ ) e MSH2-MSH3 (MutS $\beta$ ). Questi due complessi riconoscono differenti tipi di disappaiamenti: MutS $\alpha$  è responsabile della riparazione di basi mal appaiate, MutS $\beta$  è responsabile della riparazione di inserzioni o delezioni di grande entità mentre entrambi i complessi sono implicati nella riparazione di inserzioni/delezioni di una singola base. Mutazioni a carico di questi geni provocano una mancata riparazione del DNA, le mutazioni accumulate spingono la cellula in apoptosi oppure ad una proliferazione incontrollata (Kolodner *et al.*, 1996).

Il primo evento essenziale per il processo di cancerogenesi è rappresentato dalla mancata riparazione del DNA. Tuttavia, affinché l'alterazione diventi ereditabile, occorre che il segmento di DNA che contiene il danno venga replicato. Pertanto, perché l'iniziazione avvenga, le cellule alterate dal cancerogeno devono subire almeno un ciclo replicativo, in modo

che la modificazione del DNA si possa fissare e divenire permanente.

Si deve ricordare che le cellule iniziate non sono cellule tumorali; non possiedono crescita autonoma e non hanno un solo marker genotipico o fenotipico, facilmente identificabile. A differenza delle cellule normali, tuttavia, sono suscettibili all'azione di promotori, e danno origine a tumori quando sono convenientemente stimulate con agenti promuoventi (Robbins, 2000).

La **promozione** è un processo relativamente lento (anni) e reversibile, mediante il quale dalle cellule iniziate si sviluppa una neoplasia benigna. Le sostanze responsabili di tali eventi, i promoventi, non sono cancerogeni se somministrati separatamente dall'iniziante, non interagiscono direttamente con il DNA e sono quindi definiti non-genotossici.

L'evento determinato dal promotore che scatena la trasformazione cellulare e quindi lo sviluppo della neoplasia è l'induzione di una intensa proliferazione cellulare. Quest'ultima viene indotta attraverso meccanismi epigenetici, interagendo con specifici recettori di superficie e/o attivando secondi messaggeri intracellulari. Altri meccanismi prevedono un'azione genotossica indiretta realizzata attraverso l'attivazione di protossici, premutageni e precancerogeni (Paolini *et al.*, 1992 e 1994).

La **progressione** è una fase, generalmente irreversibile, che conduce all'ultimo stadio della cancerogenesi: dalla cellula tumorale benigna a quella maligna fino alla metastasi. La cellula tumorale benigna è caratterizzata da una maggiore instabilità genetica rispetto alla cellula normale di derivazione e questo

provoca l'insorgenza di nuove e numerose mutazioni genetiche che ne alterano il fenotipo. Tali danni genetici si riflettono nella comparsa di sottopopolazioni cellulari che differiscono tra loro per diverse caratteristiche quali l'invasività, la capacità di accrescimento e di formare metastasi, alterazione del metabolismo genetico (Schedin *et al.*, 2004).

## **CAPITOLO 2**

### **I test alternativi**

#### **2.1 Il saggio di cancerogenesi *in vivo* e i test alternativi**

Nel campo della tutela dell'ambiente e della salute umana, è obiettivo prioritario migliorare la comprensione dei rischi, in particolare quello cancerogeno, legati all'esposizione a contaminanti ambientali. In particolare, va perseguita l'elaborazione di metodi affidabili e convalidati e di solidi dati analitici in diverse aree dell'analisi tossicologica, unitamente allo sviluppo, convalida e applicazione di metodi e strategie innovativi, per permettere una migliore valutazione dei rischi.

Nell'ambito della valutazione del rischio da esposizione uno dei problemi maggiormente dibattuti è la qualità e la quantità di test necessari all'identificazione del potenziale cancerogeno e, più in generale, del profilo tossicologico dei contaminanti ambientali. La caratterizzazione tossicologica dovrebbe disporre di strumenti veloci, predittivi e a costo contenuto.

L'identificazione del rischio riguardante il potenziale tossicologico di una data sostanza prevede la valutazione di diversi aspetti: da una parte lo studio di proprietà tossicodinamiche e tossicocinetiche, sia qualitative che quantitative, legate all'assorbimento, al potenziale di bioaccumulo, alla distribuzione nei tessuti dell'organismo, al metabolismo ed ai fattori legati all'eliminazione attraverso gli escreti, dall'altra una valutazione tossicologica "in senso lato"

che possa fornire i parametri per una stima del rischio da esposizione a una data miscela in una matrice in modo tale da fornire relazioni dose-risposta.

I modelli *in vivo* di cancerogenesi nel roditore sono considerati affidabili per lo studio sperimentale del rischio cancerogeno per l'uomo.

Il test di cancerogenesi nell'animale (OECD, 2009) prevede la somministrazione della molecola a 3 dosaggi, per periodi molto lunghi (almeno 2 anni e spesso per tutta la vita dell'animale). Richiede un numero adeguato di animali di entrambi i sessi e di due specie differenti, normalmente ratti e topi ma anche non roditori. La somministrazione del composto oggetto d'esame deve essere effettuata, quando possibile, per vie compatibili con l'esposizione umana (generalmente orale e inalatoria).

I test a lungo termine su animali, tradizionalmente punto di sicuro riferimento per la categorizzazione dei cancerogeni, in assenza di dati epidemiologici o a rafforzamento di questi, dimostrano, oltre a "costi" di carattere etico, anche limitazioni scientifiche tali da indurre difficoltà nell'estrapolazione all'uomo. La generalizzazione da modello animale a soggetto umano è basata sulla vicinanza filogenetica tra i soggetti, presupponendo che questa vicinanza evolutiva implichi una vicinanza anche nei meccanismi fisiologici, patologici e molecolari studiati. Sono però da tenere in considerazione la variabilità tra specie, ceppo e genere unitamente alla variabilità nella risposta organo specifica sia tra specie che intraspecifica. Sussistono sostanziali differenze anche a livello metabolico: nella velocità dei meccanismi di assorbimento e di trasporto tra

vie di somministrazione diverse e tra somministrazione sperimentale e umana.

I modelli animali, inoltre, trovano un limite significativo nel loro costo e nella durata.

Nel corso degli ultimi due decenni sono stati fatti notevoli sforzi verso lo sviluppo e l'approvazione internazionale di metodi alternativi ai test che prevedono l'utilizzo di animali. Con l'istituzione dell'*Animal Welfare Guideline*, nel 1986, l'Unione Europea iniziò una politica di sviluppo e uso di metodi alternativi, definiti come “sistemi che possono essere usati per sostituire, ridurre o affinare l'utilizzo della sperimentazione animale nella ricerca biomedica, nei test e nell'istruzione”.

Tale definizione risale ad un testo del 1959 (Russell and Burch, 1959), ed è comunemente conosciuta come la definizione delle “3 R: *replace, reduce, refine*”, per cui è alternativa alla sperimentazione animale una qualsiasi tecnica che:

- Rimpiazzare totalmente l'uso degli animali con tecniche *in vitro* (*replacement*);
- Riduca il numero degli animali necessari ad eseguire un determinato saggio, pur ottenendo lo stesso livello di informazione (*reduction*);
- Raffini un metodo per ridurre la sofferenza imposta all'animale durante l'esecuzione di un saggio (*refinement*).

Il *replacement* è stato ulteriormente distinto da Russell e Burch in assoluto (l'animale non viene usato in nessuna fase dell'esperimento) e relativo (l'animale viene usato per un certo scopo, per esempio, per prelevare un organo o tessuto per preparare la coltura primaria), ma umanamente sacrificato, per limitarne al massimo la sofferenza.

La definizione di metodi alternativi include test veri e propri (*testing methods*), come esperimenti *in vitro*, *ex-vivo* o test *in vivo* ridotti, e approcci diversi (*non-testing methods*).

La necessità di sviluppare test tossicologici e di cancerogenesi *in vitro* sorge, quindi, dall'esigenza di ridurre l'uso di animali da laboratorio e contemporaneamente standardizzare sistemi rapidi e a basso costo caratterizzati da rilevanza, validità e riproducibilità.

In continuità con questa politica, il regolamento REACH (*Registration Evaluation and Authorization of CHemicals*, <http://eur-lex.europa.eu>) incoraggia l'utilizzo e alla messa a punto di metodi alternativi ai test *in vivo* convenzionali per lo screening di tossicità e di cancerogenesi e raccomanda che la registrazione delle sostanze chimiche sia raggiunta mediante il minor utilizzo possibile di sperimentazione su animali, da considerare come ultima "risorsa" per l'ottenimento di informazioni (Lilienblum *et al.*, 2008).

Gli studi *in vitro* presentano notevoli vantaggi per lo studio dei cancerogeni, quali la rapidità, l'economicità e la riproducibilità, oltre alla possibilità di valutare la relazione dose-risposta. Permettono inoltre l'identificazione di parametri critici per gli effetti avversi e lo studio dei meccanismi molecolari alla base degli effetti biologici. Nei modelli cellulari *in vitro* è, infatti, possibile verificare un pannello di marcatori biomolecolari corrispondenti a *endpoint* rilevati *in vivo* nell'animale e nell'uomo. Un buon modello *in vitro* permette di approfondire i meccanismi molecolari di trasformazione neoplastica, fornendo informazioni utili da trasferire nella pratica



clinica. In questo modo è possibile individuare il profilo di attività di composti biologicamente attivi o di associazioni di molecole evidenziando anche eventuali fenomeni di cooperazione o antagonismo.

## **2.2 Il test di trasformazione cellulare**

I modelli di trasformazione cellulare, che mimano alcune delle tappe del processo di cancerogenesi multifasica *in vivo*, sono ampiamente utilizzati per lo studio della cancerogenesi *in vitro*.

Questi modelli permettono lo studio del potenziale cancerogeno di agenti fisici, come le radiazioni, e di agenti chimici, sia singoli che associati in miscele anche complesse. Sono proposti come screening di secondo livello per cancerogeni e come test di screening di elezione per cancerogeni non genotossici, non identificabili con i test di mutagenesi.

Hanno permesso lo studio dei meccanismi cellulari e molecolari alla base della cancerogenesi e del ruolo dei cancerogeni nelle sue diverse tappe.

La trasformazione cellulare implica l'induzione in cellule in coltura di particolari alterazioni fenotipiche, che sono caratteristiche di cellule tumorali e che possono essere indotte esponendo cellule di mammifero ad agenti cancerogeni.

Il fenomeno della trasformazione morfologica delle cellule conduce a cambiamenti nel comportamento e nel controllo della crescita delle cellule in coltura, così come a modifiche della morfologia cellulare, a un *pattern* di crescita disorganizzato e all'acquisizione della capacità di crescita ancoraggio-indipendente (Combes *et al.*, 1999).

Le cellule trasformate producono fattori di crescita autocrini e possono indurre formazione di tumori quando iniettate in ospiti appropriati (tumorigenicità). Esse acquisiscono la capacità di dividersi in modo indefinito, diventando cellule definite “immortalizzate”. Tale capacità è associata ad altri cambiamenti come il cariotipo aneuploide, l’alterata stabilità genetica e la resistenza all’apoptosi.

I sistemi di trasformazione *in vitro* misurano la conversione fenotipica che conduce all’acquisizione di caratteristiche maligne in cellule di mammifero esposte a sostanze chimiche e sono capaci di rilevare sia cancerogeni genotossici che non genotossici. L’*endpoint* di questi test, facilmente individuabile, è rappresentato dal *focus* trasformato. Il numero di *foci* maligni è direttamente correlato alla dose (LeBoeuf *et al.*, 1999; Sakai, 2007).

I modelli di trasformazione *in vitro* più usati per lo studio della cancerogenicità sono il modello SHE (*Syrian Hamster Embryo cells*) e i modelli C3H 10T1/2 e BALB/c 3T3.

Le cellule SHE sono colture primarie derivate dalla disgregazione di embrioni di hamster e hanno quindi un assetto cromosomico normale. La comparsa di colonie morfologicamente trasformate viene correlata a effetti del cancerogeno sulle fasi iniziali della cancerogenesi.

Le cellule C3H e 3T3 sono invece fibroblasti murini (rispettivamente di prostata ed embrionali) immortalizzati, che quindi hanno già compiuto alcune tappe sulla via della trasformazione. La comparsa di *foci* di trasformazione sul monostrato normale è indice di effetti sulle fasi più tardive del processo di cancerogenesi.

### 2.2.1 Il modello di trasformazione BALB/c 3T3

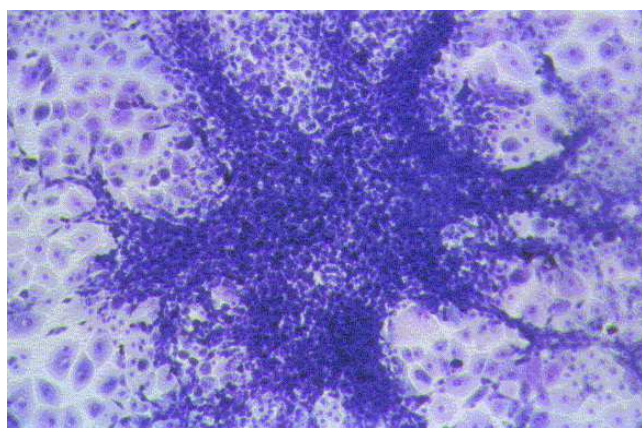
Il modello sperimentale rappresentato dal test di trasformazione cellulare BALB/c 3T3 è un utile strumento predittivo per la definizione del profilo tossicologico e della possibile attività cancerogena di composti chimici, miscele complesse o associazioni ed è in grado di fornire informazioni sul ruolo che esse hanno nelle differenti tappe del processo di cancerogenesi. La struttura stessa del test consente di programmare l'esposizione delle cellule al cancerogeno scelto sia in momenti differenti del processo multifasico di trasformazione che per tempi differenti. Viene infatti utilizzato da tempo per lo screening di cancerogeni e di promoventi (Colacci *et al.*, 1990; Perocco *et al.*, 1991; Colacci *et al.*, 1995; Colacci *et al.*, 1996; Mascolo *et al.*, 2010). Il test di trasformazione in cellule BALB/c 3T3 presenta un'elevata concordanza con i test di cancerogenesi nell'animale e può discriminare tra sostanze inizianti e promoventi, grazie all'utilizzo della variante *two-steps*.

Il protocollo sperimentale è stato sottoposto ad uno studio di prevalidazione coordinato dall'ECVAM concluso recentemente (Tanaka *et al.*, *In Press*).

Le cellule BALB/c 3T3 sono una linea stabilizzata ipotetraploide di fibroblasti embrionali murini adattati alla crescita *in vitro* (immortalizzati). Non possono essere considerate cellule completamente normali visto che il processo di immortalizzazione ha determinato l'insorgenza di aneuploidia e di una certa eterogeneità cellulare; esse dunque hanno già compiuto alcune tappe del processo di trasformazione. Tale linea

cellulare ha però conservato in maniera specifica e costante caratteristiche essenziali proprie delle cellule normali quali crescita dipendente da ancoraggio soggetta ad inibizione da contatto, formando a confluenza un monostrato continuo e regolare, assenza di tumorigenicità e bassa frequenza di trasformazione spontanea.

Il trattamento con un composto chimico o una miscela di composti cancerogeni determina la perdita di tali caratteristiche e la conseguente insorgenza di cloni di cellule trasformate (*foci*), il cui fenotipo è francamente maligno. Queste cellule trasformate sono fusiformi, formano pluristrati, sono dense, fortemente basofile e mostrano un orientamento casuale alla periferia del *focus* (**Fig. 2.1**).



**Figura 2.1:** Immagine al microscopio ottico di un *focus* trasformato con evidente carattere infiltrante nei confronti del monostrato di cellule BALB/c 3T3. Ingrandimento 40X.

La frequenza di trasformazione è, in genere, una funzione della dose di trattamento e segue un andamento tipico di un evento raro (distribuzione di Poisson), in linea con la possibilità di insorgenza di un tumore *in vivo*.

Recentemente l'OECD ha pubblicato un *Detailed Review Paper* (DRP 31) che ha revisionato tutta la letteratura pubblicata

sui test di trasformazione, al fine dello sviluppo di una linea guida OECD (OECD, 2007). La capacità del test di trasformazione di predire la cancerogenicità di composti chimici in cellule di mammifero BALB/c 3T3 è stata valutata prendendo in considerazione 186 sostanze chimiche, comprendenti:

- 165 composti chimici organici, di cui 112 risultano cancerogeni per i roditori e 53 non cancerogeni per i roditori;
- 21 composti chimici inorganici, di cui 15 risultano cancerogeni per i roditori e 6 non cancerogeni per i roditori.

Dai dati derivanti da questi studi si è visto che il 66% dei cancerogeni organici e l'87% di quelli inorganici sono risultati positivi nel saggio di trasformazione *in vitro* BALB/c 3T3 (OECD, 2007). L'analisi dei dati storici mostra che il test in BALB/c 3T3 presenta elevata concordanza con i dati di cancerogenesi *in vivo*, buona sensibilità e specificità e un buon livello di riproducibilità intra- e inter-laboratorio (OECD, 2007).

Tutti i modelli, comunque, confermano che il processo di trasformazione cellulare *in vitro* è un processo multifasico, comparabile con il processo tumorale *in vivo*, che la proliferazione cellulare dopo l'esposizione al cancerogeno è determinante per ottenere la manifestazione fenotipica dell'avvenuta trasformazione, che una esposizione efficace dipende dal ciclo cellulare e che gli effetti genotossici possono essere misurati direttamente sulle cellule trattate e correlati alla trasformazione (Kakunaga, 1985; Matthews *et al.*, 1993a; Matthews *et al.*, 1993b; Combes *et al.*, 1999; LeBoeuf *et al.*, 1999; Sakai, 2007; OECD, 2007). La possibilità di ottenere curve dose-risposta, a concentrazioni anche molto basse, crea i presupposti per un'integrazione dell'informazione mediante

modelli matematici e di simulazione per l'extrapolazione dei dati ottenuti al fine della predizione del rischio per l'uomo.

### 2.3 Tossicogenomica: la trascrittomica

“*Recital 40*: La Commissione, gli Stati membri, l'industria e gli altri soggetti interessati dovrebbero continuare a contribuire alla promozione, a livello internazionale e nazionale, di metodi di prova alternativi, tra cui metodologie assistite da computer, appropriate metodologie *in vitro*, **metodologie basate sulla tossicogenomica** e altre metodologie pertinenti. La strategia comunitaria di promozione di metodi di prova alternativi è una priorità e la Commissione dovrebbe garantire che essa rimanga tale nell'ambito dei suoi futuri programmi quadro di ricerca e di iniziative quali il piano d'azione comunitario per la protezione e il benessere degli animali 2006-2010. Si dovrebbe puntare alla partecipazione degli operatori e ad iniziative che coinvolgano tutte le parti interessate.” (Reg. EC 1907/2006).

L'avvento delle nuove tecniche di biologia molecolare, le cosiddette OMICS, dai suffissi di *transcript-omics*, *prote-omics* e *metabol-omics*, consentono lo studio dei cambiamenti cellulari mediante l'analisi dei profili, rispettivamente, dell'espressione genica, proteica e della produzione di metaboliti. Esse inoltre permettono di rivelare in una fase molto precoce lo sviluppo di un'alterazione cellulare o tissutale: in tal modo, mediante lo studio degli effetti e dei meccanismi d'azione delle sostanze in esame è possibile valutare quali siano i cambiamenti molecolari che precedono l'evento tossico in sé, definendo così una “impronta digitale” (*toxicological signature*), potenziale

biomarcatore d'effetto per uno specifico composto o per un gruppo di composti con analogo meccanismo/bersaglio.

L'applicazione delle tecnologie tossicogenomiche, con particolare riferimento alla trascrittomica, costituisce uno strumento innovativo per approfondire l'effetto di composti chimici, consentendo di monitorare l'esposizione, valutare la pericolosità e il meccanismo d'azione, classificare le sostanze tossiche, definire la risposta a dosi differenti, contribuire all'estrapolazione da specie a specie e predire la variabilità individuale, limitando nella sperimentazione l'uso di test *in vivo* e quindi il numero di animali utilizzati.

La tossicogenomica rappresenta un approccio utile, con grandi potenzialità, nella valutazione del profilo tossicologico di una sostanza o miscela perché consente di interrogare l'intero genoma in seguito all'esposizione. Si valutano in tal modo le interazioni gene-ambiente e si individuano quali geni sono attivi in una cellula in risposta ad un determinato insulto.

L'approccio più promettente per l'individuazione di biomarcatori da utilizzare nel monitoraggio ambientale è rappresentato dall'analisi trascrizionale, mediante DNA microarray, che si focalizza su quella piccola percentuale del DNA eucariotico funzionalmente attiva, ossia in grado di essere copiata in RNA messaggero (mRNA) quindi tradotto in proteine che agiscono singolarmente o dopo formazione di complessi per sostenere molteplici funzioni della cellula.

In questo modo è possibile definire i profili di espressione genica che sottendono a risposte biologiche complesse nell'intento di individuare biomarcatori in grado di predire il rischio per l'uomo, e di consentire la stima di una relazione diretta tra l'esposizione e i possibili effetti.

Il termine microarray sta per “*microscopic glass array*”, ossia disposizione ordinata, o schieramento, su un vetrino da microscopio, di elementi, o sonde, che consentono il legame specifico di geni o prodotti genici. Le singole sonde, o *probe*, di cui il dispositivo è costituito sono legate al supporto su piccole aree circolari disposte secondo un preciso ordine geometrico lungo linee orizzontali (righe) e linee verticali (colonne), in modo del tutto analogo a quello dei numeri di una matrice.

I microarray a DNA, legando gli mRNA della cellula, ne misurano, in opportune condizioni sperimentali, la quantità relativa e forniscono così una immagine dell’attività dei suoi geni, cioè dell’attività trascrizionale della cellula stessa. Ciò che si ottiene è una sorta di “foto istantanea” del quadro di espressione genica.

Il funzionamento delle matrici si basa sull’interazione di legame tra biomolecole complementari, ovvero tra le sonde fissate alla matrice e le molecole ad esse complementari (ossia in grado di formare con esse legami a elevata stereospecificità) presenti in un campione biologico. Ciascuna sonda di DNA è specifica per una singola sequenza complementare, o sequenza bersaglio, di acido nucleico previamente marcato con un fluorocromo ed è in grado di legarla anche quando questa sia presente in una miscela complessa, quale può essere un estratto cellulare, generando così un segnale misurabile.

La lettura viene effettuata eccitando il marcatore fluorescente con laser di una determinata lunghezza d’onda e misurando poi la fluorescenza emessa, anch’essa di una specifica lunghezza d’onda. I due marcatori fluorescenti più utilizzati sono il Cy3, che viene eccitato a 550 nm ed emette a 581 nm (luce



verde) e il Cy5, che viene eccitato a 649 nm ed emette a 670 nm (luce rossa).

Quando il bersaglio sia rappresentato dall'mRNA cellulare, l'intensità luminosa di ciascun elemento della matrice fornirà indicazioni sulla quantità di mRNA sintetizzato da ciascuno specifico gene. In altri termini, si otterrà un quadro dell'attività trascrizionale dei singoli geni, ossia un profilo dell'espressione genica cellulare.

Diversi dati di letteratura hanno evidenziato l'importanza di utilizzare approcci trascrizionali per lo studio di miscele ambientali come il fumo di sigaretta, emissioni diesel e particolato urbano (Maunder *et al.*, 2007; Heguy *et al.*, 2006; Verheyen *et al.*, 2004; Mahadevan *et al.*, 2005). L'effetto comune di questi contaminanti interessa la modulazione di geni coinvolti nella risposta a stress ossidativo, appartenenti al sistema di attivazione metabolica degli xenobiotici e responsabili del processo infiammatorio. Accanto alla risposta cellulare, allo stress, sono stati anche evidenziati geni specifici dell'esposizione a ogni singola miscela che hanno consentito di acquisire nuove conoscenze sul meccanismo d'azione dei contaminanti ambientali oggetto di studio (Sen *et al.*, 2007).

## CAPITOLO 3

### *Il Risk Assessment*

#### **3.1 Valutazione dell'evidenza di cancerogenicità**

Il processo di valutazione del rischio tossicologico può essere suddiviso in quattro fasi: *hazard identification*, relazione dose-risposta, valutazione dell'esposizione e caratterizzazione del rischio.

Nella lingua italiana spesso pericolo (*hazard*) e rischio (*risk*) vengono utilizzati come sinonimi, ma in ambito tossicologico non lo sono: *hazard* si riferisce alle manifestazioni tossiche osservate indotte da una quantità nota di una sostanza in condizioni note di esposizione, mentre *risk* esprime la probabilità che un pericolo (o più pericoli) identificato(i) si possa(no) realizzare in condizioni di esposizione prevedibili (Lewalle, 1999).

Si parla di sicurezza per la salute umana riguardo l'esposizione a sostanze potenzialmente tossiche e in grado di causare patologie nella popolazione, quando si può concretamente prevedere che determinate dosi giornaliere non provocheranno effetti sanitari negativi. Poiché il rischio tossicologico, e anche quello cancerogeno, pari a zero non esiste, è implicito nella definizione sopra fornita che "sicuro" non è sinonimo di assenza di rischi. Non si fa riferimento a una condizione di "rischio zero" ma alla riduzione del rischio sotto una soglia convenzionalmente accettata come sufficientemente bassa.

Dovendo convivere con fattori cancerogeni e non

esistendo il rischio zero cancerogeno, è indispensabile effettuare la stima del rischio cancerogeno.

Il primo passo nel *risk assessment* è determinare con certezza, con buona probabilità o con documentata possibilità la cancerogenicità per l'uomo di una specifica esposizione, avendo a disposizione dati adeguati e accettabili.

Gli enti che a livello internazionale si occupano di identificare e classificare i rischi di cancerogenicità di agenti ed esposizioni cancerogene sono, oltre alla Commissione della Unione Europea (UE) che produce classificazioni di pericolo (categoria 1, 2 e 3, ora IA, IB e II, ovvero accertati, probabili e possibili cancerogeni per l'uomo), l'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) che pubblica le *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, l'*US National Toxicology Program* (NTP) che pubblica con cadenza biennale il *Report on Carcinogens*, e l'*U.S. Environmental Protection Agency* (U.S. EPA) che sviluppa valutazioni del rischio cancerogeno e, a livello nazionale, la Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale (CCTN) che ha operato sino al 2001.

La IARC classifica i cancerogeni noti nei seguenti gruppi (IARC, 2010a):

- Gruppo 1: cancerogeno accertato per l'uomo: vi è sufficiente evidenza di cancerogenicità nell'uomo in studi epidemiologici adeguati oppure quando l'evidenza di cancerogenicità è insufficiente per gli esseri umani ma risulta un'evidenza sufficiente di cancerogenicità in animali da esperimento ed è noto il meccanismo d'azione nell'uomo.
- Gruppo 2A: probabile cancerogeno per l'uomo, sulla base di evidenza limitata nell'uomo e di evidenza sufficiente nei piccoli roditori. Un composto è incluso in questa categoria

anche quando è presente una inadeguata evidenza di cancerogenicità nell'uomo e una sufficiente evidenza di cancerogenicità nell'animale purchè sia dimostrato che la cancerogenesi in quest'ultimo sia mediata dallo stesso meccanismo d'azione.

- Gruppo 2B: possibile cancerogeno per l'uomo, sulla base di evidenza limitata nell'uomo e di evidenza non sufficiente nell'animale oppure di evidenza sufficiente nell'animale ed evidenza inadeguata nell'uomo oppure esclusivamente sulla base di dati relativi al meccanismo d'azione.
- Gruppo 3: non classificabile. Questa categoria di solito raccoglie agenti per cui l'evidenza di cancerogenicità è inadeguata o limitata in esperimenti su animali. In casi eccezionali, agenti la cui cancerogenicità è inadeguata per gli esseri umani ma sufficiente in animali da laboratorio possono essere collocati in questa categoria qualora vi sia una forte evidenza del fatto che il meccanismo di cancerogenicità in animali da esperimento non sia lo stesso per l'uomo.
- Gruppo 4: probabile non cancerogeno per l'uomo sulla base di evidenze che suggeriscono l'assenza di cancerogenicità nel roditore e nell'uomo e, in alcuni casi, sulla base dell'evidenza che suggerisce l'assenza di cancerogenicità nel roditore e l'inadeguatezza o la mancanza del dato sull'uomo, in presenza di altri dati rilevanti.

La classificazione CCTN era analoga a quella IARC e a quella dell'EPA che distingueva, fino a poco tempo fa, 5 gruppi (U.S. EPA, 2005):

- Gruppo A: cancerogeno per l'uomo.

- Gruppo B: probabile cancerogeno per l'uomo (B1 con evidenza limitata di cancerogenicità in studi epidemiologici; B2 con evidenza sufficiente di cancerogenicità in studi su animali).
- Gruppo C: possibile cancerogeno per l'uomo.
- Gruppo D: non classificabile come cancerogeno.
- Gruppo E: probabile non cancerogeno per l'uomo, sulla base di studi nell'animale.

### **3.2 Valutazione del rischio cancerogeno**

Per passare dall'aspetto qualitativo all'aspetto quantitativo del rischio cancerogeno è necessaria la valutazione di quella che viene chiamata la relazione dose-risposta, attraverso il calcolo della potenza dell'effetto cancerogeno.

La valutazione, nell'ambito di comitati di esperti nazionali, sovranazionali e internazionali, è effettuata caso per caso, cioè composto per composto, utilizzando una serie di dati di incidenza cumulativa di tumori indotti negli animali oppure osservati nell'uomo a vari dosaggi, generalmente alti (esposizione occupazionali).

Per le sostanze prive di effetti mutageni e cancerogeni, cioè i tossici generali e i tossici per la fertilità e lo sviluppo, vengono determinate la dose giornaliera accettabile (ADI: *Acceptable Daily Intake*) o tollerabile (TDI: *Tolerable Daily Intake*). La dose tollerabile assumibile è la stima della quantità di un contaminante chimico (sostanza indesiderata) presente che in situazioni di ineliminabilità può venire ingerita giornalmente per tutta la vita. Il termine "accettabile" si utilizza, invece, in riferimento ad una sostanza intenzionalmente aggiunta, come nel

caso di conservanti, additivi, residui di pesticidi o farmaci veterinari.

Il valore di tale dose giornaliera viene determinato, in genere, sulla base di dati di vaste sperimentazioni su diverse specie animali utilizzando, tra le tante, la dose più bassa alla quale non si è osservato alcun effetto tossico (NOAEL: *No Observed Adverse Effect Level*).

Per l'estrapolazione dall'animale all'uomo viene garantito un ampio margine di sicurezza, la dose NOAEL viene abbattuta di un fattore di sicurezza (FS) variabile da 100 a 1000, in genere pari a 100 (10 per l'estrapolazione di specie, 10 per le variabilità interindividuali nell'ambito della stessa specie).

Per la loro formulazione i valori ADI e TDI dipendono da evidenze empiriche, in relazione alla qualità dei dati, alla numerosità del campione e alla variabilità interindividuale.

Sono definite “sicure”, le esposizioni a dosaggi inferiori all'ADI o TDI, mentre il superamento della soglia, se eclatante, determinerà effetti tossici, la cui intensità, frequenza e tipologia sarà relata alla dose e all'agente (Grilli, 1992).

Nell'approccio statunitense si utilizza il termine dose di riferimento (RfD) invece di ADI/TDI.

Per le sostanze mutagene e cancerogene mutagene l'approccio è probabilistico senza soglia di dose di nessun effetto. Occorre stimare, quando i dati sono disponibili, il rischio cancerogeno in eccesso rispetto all'incidenza spontanea, moltiplicando l'unità di rischio (UR)(o potenza o *hazard*), che corrisponde al numero di tumori in eccesso attesi entro una certa dimensione di popolazione a seguito di assunzione quotidiana per tutta la vita di una dose unitaria del cancerogeno, per la reale assunzione giornaliera, misurata o stimata, di tale cancerogeno

(esposizione = E). Il rischio è pertanto:  $UR \times E$ .

L'estrapolazione all'uomo è effettuata dalle dosi alte, generalmente utilizzate nel test a lungo termine sull'animale, a quelle basse tipiche dell'esposizione della popolazione generale. Per la stima dell'*hazard* occorre, quindi, partire dai dati disponibili e concentrare l'attenzione su modellistiche matematiche che interpolano correttamente i punti disponibili e linearizzate nell'ambito delle basse dosi per poi derivarne le stime previsionali.

La dose è definita come la dose media ponderata per esposizioni croniche (per tutta la vita). Normalmente si fa riferimento alla dose applicata (sulla cute o per via orale) o di esposizione (inalazione di una determinata concentrazione in aria), mentre sarebbe opportuno il riferimento alla dose efficace sullo specifico bersaglio poiché questa prende in esame i parametri tossicocinetici che ne regolano la biodisponibilità (assorbimento, distribuzione, metabolismo ed eliminazione).

I modelli farmacocinetici (PK) sono modelli matematici modificati, anch'essi linearizzati nell'ambito delle basse dosi, che tengono in considerazione, per la stima del rischio, i vari processi metabolici subiti dalla sostanza in esame.

Il passo successivo, più raffinato, considera anche i parametri fisiologici rilevanti per la biodistribuzione delle molecole nelle varie specie e li compara. I modelli PBPK (*Physiologically-Based Pharmacokinetics*) includono il peso corporeo, i volumi tissutali, i flussi respiratori ed ematici, la ripartizione in compartimenti, ecc. Al momento sono però pochi i composti per i quali sono disponibili tutte le informazioni necessarie per l'applicazione di tale modello.

Il modello *Multistage* Linearizzato è quello più utilizzato, mima la cancerogenesi a tappe multiple con l'incidenza,  $P(d)$ , che è relata alla dose elevata a esponenti numerici crescenti ( $d^1, d^2 \dots d^n$ ). La sua formulazione è la seguente:  $P(d) = 1 - e^{-(k_0 + k_1 d + \frac{k_2 d^2}{2} + \frac{k_3 d^3}{3} + \dots + \frac{k_n d^n}{n})}$ . Dopo l'adattamento della curva ai dati sperimentali, il modello *multistage* è reso lineare alle dosi basse e molto basse considerando solo i dati relativi all'espressione  $P(d) = 1 - e^{-(k_0 + k_1 d)}$ , ove  $k_1$  (o meglio, il suo limite di confidenza superiore) è la potenza cancerogena (UR). E' il modello usato nel calcolo della dose di riferimento (*Benchmark dose*) per un incremento di effetto del 10% per i cancerogeni ed è il più cautelativo (Grilli, 1992).

L'approccio USA (U.S. EPA, 2005) utilizza da oltre 10 anni lo *Slope Factor* (SF, potenza cancerogena), calcolato dividendo l'eccesso di rischio del 10% (= 0,1) per il limite di confidenza inferiore della dose efficace 10% che determina tale eccesso di rischio ( $LED_{10}$ : *Lowest Effective Dose*).

Per cui  $SF = 0,1/LED_{10}$ .

SF identifica la pendenza della relazione lineare tra dose e risposta ed è esso stesso indice di potenza e UR se espresso in mg/kg p.c./die (via orale) o la premessa per il calcolo di UR se si tratta di inalazione di mg di cancerogeno/m<sup>3</sup> di aria: in pratica, mg/m<sup>3</sup> x 30 m<sup>3</sup>/die (inalazione di un adulto in 24 h)/60 kg (peso medio tra i 2 sessi di un adulto) determina la conversione in UR che viene così espresso in mg/kg p.c./die. I due valori utilizzati in USA sono 20 m<sup>3</sup>/die e 70 kg di p.c., ma questo cambia molto poco il risultato.



### **3.3 Stima del rischio cancerogeno da esposizioni ambientali**

Calcolato il rischio, si pone il problema della gestione e della sua tollerabilità. Le agenzie federali statunitensi U.S. EPA e *Food and Drug Administration* (FDA) hanno stabilito che un rischio in eccesso inferiore a 1 tumore su 1 milione di esposti ad una determinata dose di un singolo agente per tutta la vita è trascurabile per la popolazione generale. L'approccio italiano utilizzato dagli esperti coinvolti nella valutazione del rischio in commissioni consultive nazionali (es. prodotti fitosanitari) o comunitarie (es. varie commissioni EFSA, autorità europea per la sicurezza alimentare) è analogo.

Il discorso cambia se si tratta non di un singolo agente ma di miscele complesse, per le quali non è ancora stato stabilito un livello di rischio definibile trascurabile, e si è solo in fase iniziale di sviluppo.

Relativamente al temuto effetto sinergico delle interazioni, occorre considerare che questo non può avvenire tra diversi Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), diossine e per quei Policlorobifenili (PCB) che agiscono come le diossine in quanto comune è il recettore Ah che media i loro effetti (PCB diossino-simili). Il primo composto che interagisce con il recettore, se a bassa potenza, limita l'azione di composti a maggior potenza per sottrazione della disponibilità del recettore Ah di legarsi ad altri composti, e per cautela gli effetti dei singoli vengono sommati mentre sarebbe attesa competizione.

Per valutare il rischio per la salute umana di miscele di Idrocarburi Policiclici Aromatici le agenzie regolatorie internazionali suggeriscono di utilizzare i fattori di equivalenza

(*Potency Equivalence factors*, PEF) derivanti da studi di cancerogenesi nei piccoli roditori e che, dove disponibili, correlano il potenziale cancerogeno di IPA e idrocarburi policiclici aromatici nitrati (NIPA) a quello del Benzo(a)pirene [B(a)P] pari a 1 (**Tab. 3.1**). La potenza cancerogena di una miscela è stimata sulla base della somma dei valori trasformati in B(a)P equivalenti di ogni singolo componente.

<b>IPA</b>	<b>PEF</b>
<b>Benzo(a)pirene</b>	<b>1</b>
Antantrene	0.28*
Benz(a)antracene	0.1
Benzo(c)fenantrene	0.023*
Benzo(b)fluorantene	0.1
Benzo(j)fluorantene	0.1
Benzo(k)fluorantene	0.1
Benzo(rst)pentafene	1.1*
Benzo(g.h.i)perilene	0.01#
Ciclopenta(c.d)pirene	0.012*
Crisene	0.01
Dibenzo(a.h)acridina	0.1
Dibenzo(a.j)acridina	0.1
Dibenzo(a.h)antracene	1#
7H-Dibenzo(c.g)carbazolo	1
Dibenzo(a.e)pirene	1
Dibenzo(a.h)pirene	10
Dibenzo(a.i)pirene	10
Dibenzo(a.l)pirene	10
Fenantrene	0.00064*
Indeno[1.2.3-c.d]pirene	0.1
5-Metilcrisene	1
<b>NIPA</b>	<b>PEF</b>
<b>Benzo(a)pirene</b>	<b>1</b>
1.6-Dinitropirene	10
1.8-Dinitropirene	1
6-Nitrocrisene	10
2-Nitrofluorene	0.01
1-Nitropirene	0.1
4-Nitropirene	0.1

**Tabella 3.1:** Fattori di conversione di potenza cancerogena (PEF) per vari IPA e NIPA in B(a)P equivalenti. Dati ripresi da California EPA 2005 eccetto (\*) tratti da MOE (*Ministry of the Environment*) 1997 e (#) tratti da CCME (*Canadian Council of Ministers of the Environment*) 2008.

Acenaftene, Acenaftilene, Antracene, Benzo(e)pirene, Dibenzo(a,e)fluorantene, Fluorantene, Fluorene, Naftalene, Fenantrene e Pirene, in quanto non classificabili per cancerogenesi per l'uomo secondo U.S. EPA (<http://www.epa.gov/iris/>) e IARC di Lione (IARC, 2010), non sono considerati per la valutazione della potenza cancerogena della miscela.

Per i cancerogeni non mutageni (promotori del cancro) e per esposizione a dosi molto basse di questi composti l'approccio può essere quello a soglia (TDI) precedentemente descritto e non più la stima del rischio.

Relativamente alle diossine e furani (PCDD e PCDF) l'approccio è duplice: quello europeo e del WHO (*World Health Organization*) che ritengono esista soglia di non effetto e mirano a TDI definita in 2 pg/kg p.c./die come assunzione massima senza effetti sia tossico-riproduttivi (a soglia) che cancerogeni (la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-para-diossina è un promotore); e quello statunitense che, tra molte contraddizioni, valutazioni e rivalutazioni tuttora in corso, considera maggiormente l'effetto cancerogeno con relazione lineare tra dose e risposta e quindi senza soglia: in tal caso l'unità di rischio cancerogeno è, secondo California EPA (California EPA, 2005),  $3.8 \times 10^{-5}$  per assunzione di 1 pg TCDD/m<sup>3</sup>/die per tutta la vita.

Delle 210 diossine solo 17 hanno una valenza tossicologica e una sola, la 2,3,7,8-TCDD, è classificata dalla IARC come accertato cancerogeno per l'uomo. L'effetto più temibile è comunque quello di tossicità sullo sviluppo che si manifesta anche a dosi più basse e che ha però soglia di dose sotto la quale non si ha effetto. Per valutare il loro effetto cancerogeno si utilizza il valore trasformato di ogni singola

diossina e PCB diossino-simili in TCDD equivalenti (TEQ) riferiti alla diossina di Seveso (2,3,7,8-TCDD), mediante un sistema di TEF (*TCDD Equivalency Factors*) definito a livello internazionale (Van den Berg *et al.*, 2006) e riportato nella **Tabella 3.2**.

<b>PCDD e PCDF</b>	<b>TEF</b>
<b>2,3,7,8-TCDD</b>	<b>1</b>
1,2,3,7,8-PnCDD	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01
OCDD	0.0003
2,3,7,8-TCDF	0.1
1,2,3,7,8-PnCDF	0.03
2,3,4,7,8-PnCDF	0.3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01
OCDF	0.0003
<b>PCB (n. IUPAC)</b>	<b>TEF</b>
3,4,4',5-TCB (81)	0.0003
3,3',4,4'-TCB (77)	0.0001
2,3,4,4',5-PnCB (123)	0.00003
2,3',4,4',5-PnCB (118)	0.00003
2,3,4,4',5-PnCB (114)	0.00003
2,3,3',4,4'-PnCB (105)	0.00003
3,3',4,4',5-PnCB (126)	0.1
2,3',4,4',5,5'-HxCB (167)	0.00003
2,3,3',4,4',5-HxCB (156)	0.00003
2,3,3',4,4',5'-HxCB (157)	0.00003
3,3',4,4',5,5'-HxCB (169)	0.03
2,3,3',4,4',5,5'-HpCB (189)	0.00003

**Tabella 3.2:** Fattori di tossicità equivalente per diossine, furani e PCB diossino-simili. **Abbreviazioni:** PnCDD, pentaclorodibenzo-*p*-diossina; HxCDD, esaclorodibenzo-*p*-diossina; HpCDD, eptaclorodibenzo-*p*-diossina; OCDD, octaclorodibenzo-*p*-diossina; PnCDF, pentaclorodibenzofurano; HxCDF, esaclorodibenzofurano; HpCDF, eptaclorodibenzofurano; OCDF, octaclorodibenzofurano; TCB, tetraclorodifenile; PnCB, pentaclorodifenile; HxCB, esaclorodifenile; HpCB, eptaclorodifenile

Per quanto riguarda i PCB non diossino-simili, che a differenza delle diossine planari (e dei PCB diossino-simili coplanari) hanno una tossicità non relata al meccanismo del recettore Ah, si utilizza il TDI non diossino-simili pari a 0,01 µg/kg p.c./die (valori relativi alla base di 7 PCB indicatori: n. 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180; RIVM, 2001).

## CAPITOLO 4

### Il Particolato Atmosferico

#### 4.1 Caratteristiche generali del Particolato Atmosferico

Con il termine particolato atmosferico (*particulate matter*, PM) si fa riferimento all'insieme di particelle disperse in atmosfera, solide e liquide, con diametro compreso tra qualche nanometro (nm) e decine/centinaia di micrometri ( $\mu\text{m}$ ).

Il particolato è costituito da una miscela complessa ed eterogenea di sostanze, organiche ed inorganiche, la cui composizione varia nel tempo e nello spazio, in dipendenza dalla sorgente di emissione, dalla chimica dell'atmosfera e dalle condizioni meteorologiche. Tra queste troviamo sostanze diverse come sabbia, ceneri, polveri, fuliggine, sostanze silicee di varia natura, sostanze vegetali, composti metallici, fibre tessili naturali e artificiali, sali ed elementi come il carbonio o il piombo. L'insieme delle particelle sospese in atmosfera è definito come **polveri totali sospese (PTS)** e, in base alla natura e alle dimensioni delle particelle, vengono distinte in (Marconi, 2003):

- aerosol, costituiti da particelle solide o liquide con un diametro inferiore a  $1 \mu\text{m}$ ;
- foschie, particelle generalmente liquide con diametro inferiore a  $2 \mu\text{m}$ ;
- fumi, dati da particelle solide con diametro inferiore ai  $2 \mu\text{m}$  e trasportate da miscele di gas;
- polveri (vere e proprie), costituite da particelle solide con diametro fra  $0.25$  e  $500 \mu\text{m}$ ;



- sabbie, date da particelle solide con diametro superiore ai 500  $\mu\text{m}$ .

Le particelle aerodisperse presentano forme irregolari e sono descritte facendo riferimento al diametro aerodinamico equivalente ( $d_{ae}$ ), definito come il diametro di una particella sferica avente densità unitaria ( $1 \text{ g/cm}^3$ ) e un comportamento aerodinamico, in particolare la velocità di sedimentazione e la capacità di diffondere entro filtri di determinate dimensioni, uguale a quello della particella considerata nelle medesime condizioni di temperatura, pressione e umidità relativa.

Il concetto di diametro aerodinamico equivalente è utile ai fini della classificazione del particolato in categorie.

Nel 1987 la U.S. EPA ha introdotto le definizioni di  $\text{PM}_{10}$  e, successivamente, di  $\text{PM}_{2.5}$  come “porzione di particolato raccolta da un sistema di campionamento rispondente a determinate caratteristiche geometriche in relazione ai flussi di prelievo”.

In tal senso si può ricorrere ai seguenti termini:

- $\text{PM}_{10}$  o particolato grossolano: è la frazione di particolato raccolta da un sistema di campionamento grazie al quale le particelle con diametro aerodinamico inferiore a 10  $\mu\text{m}$  sono campionate con efficienza del 50%.
- $\text{PM}_{2.5}$  o particolato fine: è la frazione di particolato costituito da particelle con diametro aerodinamico inferiore a 2.5  $\mu\text{m}$  campionate con efficienza del 50%; rappresentano circa il 60% delle  $\text{PM}_{10}$ .

Per dimensioni ancora inferiori si parla di particolato ultrafine (UFP o UP)

- $\text{PM}_1$  con diametro inferiore a 1  $\mu\text{m}$ ,

- $PM_{0.1}$  con diametro inferiore a  $0.1 \mu m$  e nanopolveri che costituiscono la frazione di particolato le cui particelle hanno il diametro dell'ordine di grandezza dei nanometri.

## 4.2 Origine del Particolato Atmosferico

Il particolato può essere suddiviso, oltre che in funzione delle particelle che lo compongono, anche in base ai processi che lo hanno generato: le particelle primarie sono quelle che vengono emesse come tali dalle sorgenti naturali ed antropiche, mentre le secondarie si originano da una serie di reazioni chimiche e fisiche in atmosfera.

Il particolato primario è costituito da particelle fini e grossolane originatesi direttamente da processi meccanici di erosione, dilavamento e rottura di particelle più grandi, da processi di evaporazione dello spray marino in prossimità delle coste, da processi di combustione ed è emesso in atmosfera direttamente nella sua forma finale da sorgenti identificabili. Esso sarà dunque molto concentrato nell'aria in prossimità del punto di emissione.

Al contrario, il particolato secondario è costituito quasi esclusivamente da particelle dal diametro inferiore a  $2.5 \mu m$ .

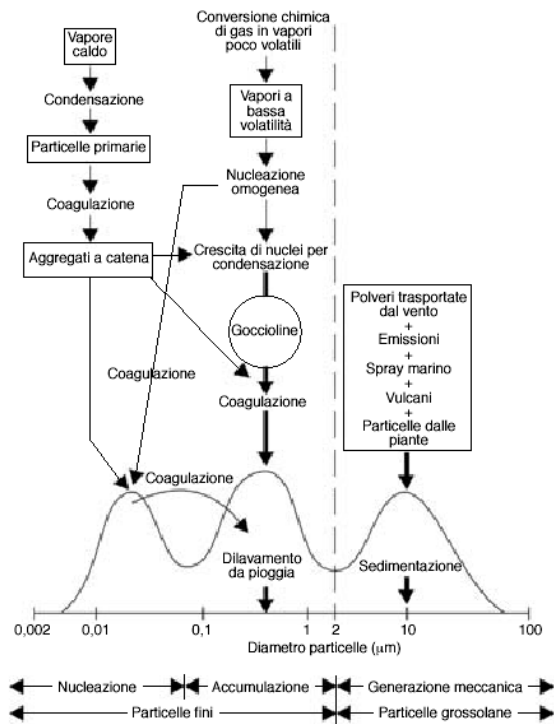
Il processo principale di genesi delle particelle fini dell'aerosol atmosferico è la nucleazione; grazie ad essa si originano particelle di dimensioni maggiori a partire da quelle ultrafini e dai radicali presenti in fase gassosa presenti in atmosfera, che si aggregano per costituire particelle più grandi (Hamed *et al.*, 2007). Alcuni studi hanno messo in evidenza

come l'acido solforico sia la principale specie gassosa che funge da iniziatore del processo di nucleazione.

La condensazione inizia quando l'equilibrio si sposta verso la fase aerosol e coinvolge principalmente le particelle con diametro compreso tra 0.1  $\mu\text{m}$  e 1  $\mu\text{m}$ .

Un altro fenomeno che porta all'accrescimento delle particelle è la coagulazione, che coinvolge sia particelle solide che liquide, le quali interagiscono con quelle prodotte dalla nucleazione. La coagulazione può interessare anche i prodotti derivanti da reazioni omogenee che avvengono nell'atmosfera (Raes *et al.*, 1997).

La **Figura 4.1** rappresenta la distribuzione dimensionale in termini di massa o volume delle particelle aerodisperse, l'origine e le reazioni dinamiche tra le particelle ed il mezzo in cui sono sospese.



**Figura 4.1:** Genesi delle particelle fini e grossolane.

La composizione del particolato dipende dall'area di provenienza e dalla tipologia di sorgente di emissione (Schauer *et al.*, 1996). Le particelle possono essere prodotte ed immesse in atmosfera attraverso fenomeni naturali o antropogenici.

Sorgenti naturali sono, ad esempio, l'erosione delle rocce e del suolo ad opera di agenti atmosferici, incendi boschivi, eruzioni vulcaniche, spray marino, materiale biologico come pollini, residui vegetali e animali, spore e batteri.

I fattori antropici generano solamente una piccola percentuale delle PTS totali, circa il 10% ma questa quantità diventa molto rilevante nei centri urbani. Tra le principali fonti antropiche possiamo trovare: processi di combustione dei veicoli, processi industriali non confinati (raffinerie, processi chimici, operazioni minerarie e cementifici), riscaldamento domestico, inceneritori e centrali elettriche, usura del manto stradale, dei freni e degli pneumatici delle vetture e lavorazioni agricole (uso di fertilizzanti ed anticrittogamici).

La concentrazione in aria delle particelle è fortemente condizionata dalla natura dei venti, dalle precipitazioni e dalle caratteristiche aerodinamiche, che dipendono da stato fisico, forma, dimensioni e densità. La permanenza in atmosfera viene comunque limitata dalla naturale tendenza alla deposizione per effetto della gravità e/o per deposizione secca o per l'intervento delle precipitazioni (Ferm *et al.*, 2006). Le particelle con un diametro superiore a 50  $\mu\text{m}$ , visibili in aria, sedimentano piuttosto velocemente causando fenomeni di inquinamento su scala molto ristretta, mentre le più piccole possono rimanere in sospensione per molto tempo.

Il trasporto a lunga distanza è governato principalmente dall'azione del vento. Si è osservato che particelle con diametro

minore di 10  $\mu\text{m}$  sono capaci di coprire distanze superiori ai 5000 km, soprattutto in regioni marine. Tale fenomeno è stato osservato analizzando campioni di aerosol raccolti lungo le coste dell'Atlantico occidentale, in cui è stata trovata polvere proveniente dal deserto del Sahara (Prospero *et al.*, 2001).

### 4.3 Composizione chimica del PM

La composizione chimica del particolato atmosferico varia in funzione delle caratteristiche della zona di provenienza nonché dalla tipologia delle sorgenti di emissione. Il particolato atmosferico, come già detto, è una miscela complessa di sostanze organiche e inorganiche, fra le quali si possono trovare solfati, nitrati, ammoniaca, carbonio elementare e composti organici, specie cristalline, sali marini e metalli pesanti.

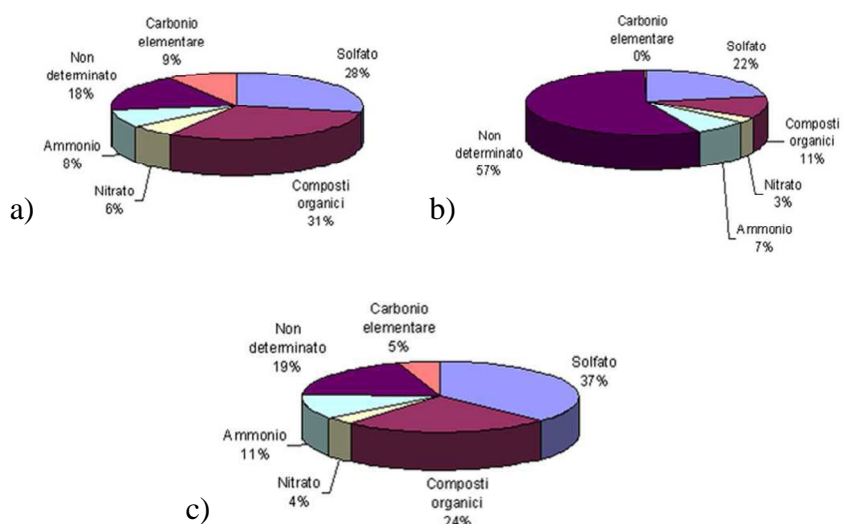
Il solfato, l'ammonio, il carbonio organico e alcuni metalli di transizione predominano nelle particelle fini, che sono legate principalmente a fonti secondarie. Tuttavia, nella frazione fine si trovano anche composti di origine primaria, come il carbonio elementare (di origine antropica) e organico (alcani, alcheni, alchilbenzeni, idrocarburi policiclici aromatici, aldeidi, acidi organici e carbossilici e nitrocomposti) e alcuni metalli (Putaud *et al.*, 2004).

Al contrario, i materiali cristallini (silicio, calcio, magnesio, alluminio, ferro ecc.) e le particelle organiche biogeniche (polline, spore, frammenti di piante) fanno parte solitamente della frazione grossolana, che deriva principalmente da fonti primarie.

Gli ioni inorganici solubili in acqua costituiscono uno dei maggiori componenti del particolato atmosferico:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,

$\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$  predominano nel particolato grossolano, invece,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{NH}_4^+$  si trovano preferibilmente nel particolato fine (Seinfeld *et al.*, 2006).

La composizione chimica del particolato (**Fig. 4.2**) dipende dall'area di provenienza e dalla tipologia delle sorgenti di emissione dominanti, cioè dal tipo di insediamenti della zona, e, poiché le particelle possono rimanere sospese nell'aria e quindi essere trasportate anche a grandi distanze, il loro carico dipende non solo dalle fonti locali ma anche dalla quota trasportata.



**Figura 4.2:** Composizione percentuale tipica del particolato di origine urbana(a), naturale(b) e rurale(c) (fonte: Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare).

#### 4.4 Effetti del Particolato Atmosferico

Le particelle di origine primaria o secondaria, ed in particolare quelle di piccole dimensioni, svolgono un importante ruolo tra gli inquinanti atmosferici a causa dei loro effetti negativi sulla salute umana e per il forte impatto ambientale.

Alla presenza di polveri sospese in atmosfera sono infatti legati fenomeni quali la formazione di nebbie e nubi, la variazione delle proprietà ottiche dell'atmosfera con effetti sulla visibilità e sul bilancio energetico terrestre, la contaminazione delle acque e del suolo attraverso deposizione secca e umida, la catalisi di reazioni chimiche in atmosfera ed il danneggiamento dei materiali.

Il particolato atmosferico assorbe e riflette le radiazioni provenienti dal Sole in funzione della dimensione e della composizione chimica delle particelle che lo compongono e della lunghezza d'onda della radiazione stessa (Sokolik *et al.*, 1996). Esso ha quindi un'influenza diretta sul bilancio energetico terrestre, a cui è legato il clima. L'elevato inquinamento nei centri urbani, per esempio, favorisce la formazione di nubi e nebbia perché le particelle fungono da nuclei di condensazione per il vapore acqueo, determinando così un aumento delle precipitazioni (Levin *et al.*, 2009).

Le polveri sospese, inoltre, hanno effetti sul microclima urbano poiché inibiscono la perdita di radiazioni ad onde lunghe durante la notte e riducono la quantità di radiazione solare che raggiunge il suolo.

Il particolato atmosferico, in seguito a deposizione secca o umida, contribuisce a processi di acidificazione (associata in particolare ad  $H_2SO_4$  e  $HNO_3$ ) e di eutrofizzazione (associata ai

sali nitrati) degli ecosistemi terrestre e acquatico. Ha effetti diretti sulla vegetazione in relazione all'azione acida e ossidante delle particelle, che porta al danneggiamento dei tessuti vegetali. Le polveri provenienti dai forni per cemento, per esempio, interagendo con la nebbia o la pioggia, formano una spessa crosta sulla superficie fogliare e interferiscono, così, con la fotosintesi e lo sviluppo della pianta.

La sedimentazione del particolato è causa anche della degradazione del patrimonio artistico, architettonico ed archeologico. Un primo danno è causato dall'annerimento dei materiali seguito da processi corrosivi che si intensificano con l'aumento dell'umidità in atmosfera (Ferm *et al.*, 2006).

#### **4.5 Effetti del PM sulla salute umana**

La proporzione del materiale particellare totale che viene inalata nel corpo umano dipende dalle proprietà delle particelle, dalla velocità e direzione di spostamento dell'aria vicino all'individuo, dalla sua frequenza respiratoria e dal tipo di respirazione (nasale/orale).

L'azione tossica del PM viene esercitata in modo preponderante a carico dell'apparato respiratorio ed il fattore rilevante per lo studio degli effetti è la dimensione delle particelle in quanto da essa dipende la capacità di penetrazione nelle varie regioni del tratto respiratorio (Jansen *et al.*, 2005).

Sulla base del comportamento aerodinamico si distinguono tre frazioni di particolato (**Fig. 4.3**).

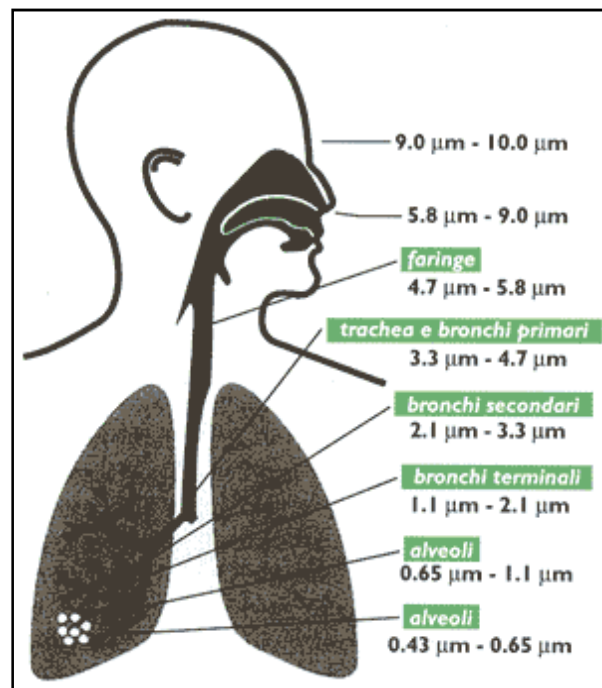
Le particelle più grandi (con  $d_{ae}$  maggiore di 10  $\mu\text{m}$ ), in questo contesto chiamate frazione inalabile, penetrano nel tratto respiratorio superiore fino alla zona naso-faringea, ove vengono



filtrate e bloccate. Quando le particelle si trovano nella zona naso-laringea esse possono essere espulse o, in alcuni casi, raggiungere la zona posteriore della faringe ed essere inghiottite.

Le particelle con  $d_{ae}$  inferiore a  $10 \mu\text{m}$ , dette frazione toracica, sono in grado di superare il tratto extratoracico (cavità nasali, faringe e laringe) raggiungendo facilmente la zona tracheo-bronchiale. Particelle di dimensioni minori ( $d_{ae}$  compreso fra circa  $2.5 \mu\text{m}$  e  $3.3 \mu\text{m}$ ) si fermano prima dei bronchioli.

La frazione respirabile, infine, comprende le particelle caratterizzate da un  $d_{ae}$  inferiore a  $2.5 \mu\text{m}$ , capaci di raggiungere la zona alveolare, penetrando negli alveoli stessi quando il loro  $d_{ae}$  è minore di  $1 \mu\text{m}$  circa.



**Figura 4.3:** Principali livelli di deposizione polmonare sulla base del diametro delle particelle.

La frazione UFP, quindi, è quella che riesce a penetrare più profondamente nell'apparato respiratorio fino a raggiungere il circolo sanguigno (Nemmar *et al.*, 2002). In particolare, le UFP solide e poco solubili non vengono rimosse efficientemente attraverso meccanismi mucociliari o mediati da macrofagi, aumentando così la probabilità di una loro traslocazione verso siti extrapolmonari quali interstizi, linfa e circolazione sanguigna (Elder *et al.*, 2006).

Il particolato che si deposita nel tratto superiore dell'apparato respiratorio (cavità nasali, faringe e laringe) può generare localmente vari effetti irritativi come infiammazione e secchezza (Brunekreef *et al.*, 2005).

Diversi studi hanno evidenziato che gli effetti biologici delle particelle aerodisperse dipendono, oltre che dalle dimensioni, anche dalla natura chimica del particolato, dalla forma e dalla granulometria.

A causa della loro particolare struttura superficiale le particelle che costituiscono il particolato atmosferico fungono da adsorbente e da catalizzatore e quindi da veicolo all'interno del nostro organismo dei contaminanti aerodispersi (composti organici, metalli e ioni) tra i quali troviamo: n-alcani, acidi carbossilici, benzaldeide, acidi benzoici, IPA, ferro, vanadio, nickel, rame, platino, solfati (di solito sotto forma di ammonio solfato) e nitrati (di solito sotto forma di nitrato di ammonio o di sodio). Va infine ricordato che tanto più le particelle sono piccole, maggiore è la loro superficie totale e quindi maggiore il carico potenziale di agenti tossici che esse possono adsorbire e veicolare nel tratto respiratorio.

Il contributo dei diversi inquinanti presenti nell'aria urbana a determinare gli effetti dannosi per la salute dipende

dalle loro caratteristiche tossicologiche e dalle modalità di interazione con l'organismo umano, oltre che dalla dose di inquinanti assunta da ciascun individuo.

L'azione tossica del **monossido di carbonio (CO)** è legata principalmente alle sue interazioni con l'emoglobina del sangue. L'affinità del CO per il ferro emoglobinico è circa 240 volte più alta di quella dell'ossigeno. Il legame del CO con l'emoglobina comporta una diminuzione della capacità del sangue di trasportare ossigeno e inoltre una diminuzione della capacità di rilascio dell'ossigeno nei tessuti. Questi due fenomeni concorrono a determinare ipossia tissutale. Esposizioni acute a concentrazioni nel *range* 50-100 mg/m<sup>3</sup> causano alterazioni visive e dei riflessi, riduzione di tolleranza alla fatica e dispnea fino ad alterazioni cardiovascolari e polmonari. Un'indagine condotta da Fusco *et al.* (2001) ha messo in rilievo un incremento dei ricoveri per patologie cardiovascolari, in particolare per malattie ischemiche del miocardio, nei giorni in cui è più elevata la concentrazione ambientale di CO (incremento di circa il 4% per ogni incremento di 1 mg/m<sup>3</sup> di CO). E' stata inoltre evidenziata una associazione tra la concentrazione ambientale di CO ed i ricoveri ospedalieri per cause respiratorie (incremento di circa il 2.5% per ogni incremento di 1 mg/m<sup>3</sup> di CO). L'effetto più forte sui ricoveri per cause respiratorie è stato osservato nella classe di età 0-14 anni (aumento di circa 7.0-10.0% per ogni incremento di 1 mg/m<sup>3</sup> di CO).

Gli **ossidi di zolfo** esplicano effetti tossici a concentrazioni al di sopra di 0.5 mg/m<sup>3</sup>. Tali effetti comprendono irritazione delle mucose respiratorie e degli occhi, broncocostrizione e, nelle esposizioni a lungo termine, riduzione

della *clearance* mucociliare, con conseguente aumento delle infezioni respiratorie. Nell'atmosfera si ritrovano normalmente sia l'Anidride Solforosa o Biossido di Zolfo (SO<sub>2</sub>) che l'Anidride Solforica (SO<sub>3</sub>). Vista l'elevata solubilità in acqua del Biossido di Zolfo, questo viene facilmente assorbito dalle mucose del naso e del tratto superiore dell'apparato respiratorio.

In uno studio condotto su bambini della repubblica Ceca si nota un incremento del 74% della mortalità per cause respiratorie per un incremento di 0.5 mg/m<sup>3</sup> di SO<sub>2</sub> (WHO, 2005; Bobak *et al.*, 1999). Negli adulti l'incremento di 10 µg/m<sup>3</sup> determina un aumento del 6.25% di mortalità giornaliera acuta per varie cause (*Waste incineration and Public health*, 2000).

Gli **ossidi d'azoto (NO<sub>x</sub>)** presenti in atmosfera, e rilevanti dal punto di vista dell'inquinamento atmosferico sono l'Ossido di Azoto o Monossido di Azoto (NO) ed il Biossido di Azoto (NO<sub>2</sub>); sono tossici a concentrazioni sopra i 200 µg/m<sup>3</sup>. Hanno effetti analoghi a quelli degli ossidi di zolfo. Sono inoltre altamente reattivi e partecipano alla formazione dello smog fotochimico e di derivati nitrati degli IPA. Diversi studi associano l'incremento dei livelli di NO<sub>2</sub> con diversi effetti sulla salute sia nel bambino che nell'adulto.

In uno studio condotto a Taiwan, l'incremento del 10% della concentrazione di NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e PM<sub>10</sub> (effetto cumulativo) induce un aumento del 0.3-1.3% di visite per infezioni delle basse vie respiratorie in bambini (0-14 anni) (WHO; 2005).

In uno studio condotto su bambini della Repubblica Ceca si osserva un incremento del 66% della mortalità per cause respiratorie per un incremento di 50 µg/m<sup>3</sup> di NO<sub>2</sub> (Boback *et al.*, 1999). L'incremento di 50 µg/m<sup>3</sup>, inoltre, induce un aumento del 3.7% di ricoveri in bambini per asma acuto e l'incremento di

42  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  determina un aumento del 6.1-12% di attacchi d'asma. Infine l'incremento di 19-20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  determina un aumento dell'8% di nascite premature, del 5% di ritardo di crescita intrauterina e del 15% di morti improvvise infantili.

Negli adulti sono stati osservati sia effetti a breve che a lungo termine (Forastiere *et al.*, 2006):

- L'incremento di 45  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  induce un eccesso dello 0.9% per mortalità totale (+ 6.6% di mortalità per cause respiratorie e + 3.2% per cause cardiovascolari).
- L'incremento di 50  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  (1 h) induce un aumento dello 0.6% di mortalità per tutte le cause (studio APHEA-2).
- L'incremento di 19  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  determina un aumento del 2.26% di ricoveri per asma, del 12.8% di ricoveri per tutte le cause respiratorie e dell'1.75% delle visite per patologie polmonari ostruttive croniche.
- L'incremento di 19  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  determina un aumento del 2-7% di sintomi bronchiali.
- L'incremento di 19  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  determina un aumento del 76% di difficoltà respiratorie e del 110% di asma.

La molecola dell'**ozono** essendo estremamente reattiva, è in grado di ossidare numerosi componenti cellulari, fra i quali amminoacidi, proteine e lipidi. Può causare irritazione agli occhi ed alla gola, irritazioni all'apparato respiratorio, tosse e difficoltà respiratorie. L'azione tossica dell'Ozono viene amplificata sinergicamente dalla presenza di altri ossidanti fotochimici, come i Biossidi di Zolfo e di Azoto. Nello studio condotto da Fusco *et al.* (2001) i livelli di ozono durante i mesi estivi sono risultati associati ad un aumento dei ricoveri giornalieri per malattie dell'apparato respiratorio totali e per infezioni

respiratorie acute nella classe di età 0-14 anni (aumento dei ricoveri giornalieri del 5.5% e dell'8.2% rispettivamente).

Il **benzene** è un idrocarburo aromatico che deriva soprattutto dalle benzine “verdi”, dove contribuisce ad aumentare il numero di ottano delle benzine. Il benzene presente nell'ambiente deriva sia da processi naturali che da attività antropiche. Le fonti naturali fra le quali vi sono essenzialmente le emissioni vulcaniche e gli incendi boschivi, danno un contributo relativamente esiguo se confrontato con le quantità emesse da fonti antropogeniche. Fra le principali fonti antropiche sono comprese le attività industriali come la produzione di plastiche o resine che causano spesso l'emissione di questo tipo di inquinante, il fumo di tabacco, le combustioni incomplete di carbone e petrolio, nonché il traffico con l'emissione dei gas di scarico esausti. L'esposizione al benzene avviene essenzialmente per inalazione (circa il 99% del benzene assunto), per contatto cutaneo o per ingestione (consumo di cibo o di bevande contaminate). Gli effetti tossici provocati da questo composto organico hanno caratteristiche diverse e colpiscono organi sostanzialmente differenti in base alla durata dell'esposizione. La respirazione di aria contaminata da benzene a livelli elevati produce stati confusionali, tachicardia, mal di testa, tremore ed incoscienza; livelli molto elevati possono essere mortali. L'ingestione di cibi contaminati da benzene può causare vomito, irritazione delle pareti gastriche, sonnolenza, convulsioni, tachicardia e morte (Galbraith *et al.*, 2010). Gli effetti tossici di tipo cronico interessano essenzialmente le cellule sanguigne e gli organi che le producono come il midollo osseo. È riconosciuto cancerogeno per l'uomo e l'esposizione cronica può provocare leucemia mieloide acuta (Wong *et al.*, 2010).

Gli **idrocarburi policiclici aromatici**, sono una classe di composti, di cui il più noto è il benzo(a)pirene, caratterizzati strutturalmente da due o più anelli benzenici condensati fra loro. Normalmente in aria non si trovano mai IPA singoli ma piuttosto miscele degli stessi, le cui quantità dipendono naturalmente dalla tipologia del processo che li ha generati nonché dalle condizioni chimico-fisiche in cui esso avviene. Fra le fonti naturali degli IPA particolare interesse rappresentano le eruzioni vulcaniche e gli incendi boschivi. Gli IPA prodotti da cause antropiche, ovvero quelle umane derivano principalmente da combustioni incomplete di prodotti organici come il carbone, il petrolio, il gas o i rifiuti, senza tralasciare le emissioni dovute al traffico stradale. Fra le sorgenti *indoor*, il fumo di tabacco rappresenta una sorgente particolarmente importante così come il riscaldamento domestico quando vi è l'utilizzo di legna o carbone. L'inalazione, l'ingestione ed il contatto cutaneo sono le principali vie attraverso le quali gli IPA possono entrare nel corpo ed essendo liposolubili, riescono ad attraversare molto facilmente le membrane cellulari, penetrando e depositandosi nei tessuti adiposi (Sartorelli *et al.*, 2010; Van Rooij *et al.*, 1993).

Dal punto di vista tossicologico, al di là di effetti irritanti su mucose e congiuntive evidenti per alte esposizioni (ATSDR, 1995), di sicuro rilievo è in questo senso il potenziale cancerogeno riconosciuto dalla IARC per cute e apparato respiratorio di alcuni IPA, fra i quali il benzo(a)pirene classificato in categoria 1 (MOE, 1997; IARC, 2010). Pur essendo lo studio di queste miscele particolarmente complicato, è stato comunque dimostrato che l'esposizione alle miscele IPA comporta un aumento dell'insorgenza del cancro del tratto respiratorio e urinario (Bosetti *et al.*, 2007), della cervice uterina

(Boffetta *et al.*, 2001), dell'ovario (Guo *et al.*, 2004) e a livello gastrico (Sjödahl *et al.*, 2007), renale (Ji *et al.*, 2005), cerebrale (Boeglin *et al.*, 2006) e mammario (Crouse *et al.*, 2010).

Effetti genotossici di alcuni IPA sono stati dimostrati sia in test *in vivo* su topi che in test *in vitro* su linee cellulari mammarie, incluse linee umane (Kawanishi *et al.*, 2009).

L'esposizione a IPA determina effetti avversi anche nella riproduzione. Molti studi dimostrano che dosi elevate di IPA agiscono sullo sviluppo fetale in roditori determinando malformazioni, morte fetale, clastogenicità e tumorigenicità (Muller, 2002).

Con il termine generico di **diossine** ci si riferisce comunemente a un gruppo di 210 composti chimici aromatici policlorurati, divisi in due famiglie: policlorodibenzo-p-diossine (PCDD o diossine propriamente) e policlorodibenzofurani (PCDF o furani), caratterizzati da proprietà chimiche simili. In base al numero e alla posizione degli atomi di cloro è possibile distinguere 75 congeneri di PCDD e 135 congeneri di PCDF, 17 dei quali hanno rilevanza tossicologica. I policlorobifenili (PCB) costituiscono un ulteriore gruppo di 209 congeneri, dei quali 12 presentano proprietà tossicologiche simili alle diossine e sono pertanto definiti PCB diossino-simili. Nella maggior parte dei compartimenti ambientali (aria, acqua, suolo) queste sono presenti in miscele complesse (PCDD + PCDF + PCB).

Tra le diossine, la 2,3,7,8-TCDD è il congenere più tossico. Sono noti numerosi effetti specie-specifici e tessuto-specifici a carico del sistema immunitario, dell'apparato endocrino (diabete, disfunzioni tiroidee), dell'apparato riproduttivo (endometriosi, infertilità, disordini alla pubertà), del fegato e della cute; inoltre, è caratterizzata da un'azione



embriotossica ed è in grado di indurre trasformazioni di tipo neoplastico con insorgenza soprattutto di linfomi, sarcomi, tumori dell'apparato digerente, tumori del fegato e delle vie biliari, tumori polmonari, tumori della tiroide, tumori ormono correlati quali cancro alla mammella ed alla prostata (Van den Berg, 2006).

L'*American Thoracic Society* (ATS) ha definito in modo sistematico gli effetti sulla salute attribuibili all'azione degli inquinanti ambientali (ATS, 2000). Tali effetti possono essere di tipo acuto (aggravamento di sintomi respiratori e cardiaci in soggetti predisposti, infezioni respiratorie acute, crisi di asma bronchiale, disturbi circolatori ed ischemici, incremento della mortalità), quando si manifestano nella popolazione in seguito a variazioni a breve termine (nell'arco di ore o di una o alcune giornate) nella concentrazione degli inquinanti; oppure di tipo cronico (incremento delle patologie polmonari ostruttive croniche, diminuzione della capacità polmonare, bronchite cronica, riduzione dell'aspettativa di vita, soprattutto dovuto a mortalità per cause polmonari e probabilmente cancro al polmone) associati ad un'esposizione di lunga durata a basse concentrazioni di inquinanti o ad esposizioni ripetute.

#### **4.5.1 Tossicità del particolato**

Diversi studi di tossicità, sia *in vitro* che *in vivo*, documentano i diversi effetti tossici associati all'esposizione di sistemi biologici a particolato di varia natura, ma comunque derivante da emissioni presenti nell'aria urbana, o simile a queste per caratteristiche chimico-fisiche.

Il particolato delle emissioni diesel è risultato citotossico *in vitro*, in colture primarie di cellule epiteliali nasali umane e in linee di cellule epiteliali bronchiali umane, in grado di fagocitare le particelle e nelle quali tale particolato ha indotto anche l'aumento del rilascio di varie citochine con azione pro infiammatoria: IL-8, GM-CSF e IL-1 $\beta$  (Boland *et al.*, 1999), TNF- $\alpha$ , IL-6 e MIP-2 (Steenhof *et al.*, 2011). L'attività pro infiammatoria del particolato è dovuta agli effetti diretti su elementi cellulari polmonari strutturali ed accessori, in particolare gli pneumociti di tipo II ed i macrofagi alveolari. In seguito all'attivazione degli pneumociti e dei macrofagi alveolari vengono prodotte localmente citochine, chemiochine e specie radicaliche (sia specie reattive dell'ossigeno, sia specie reattive dell'azoto), che oltre ad esercitare un'azione tossica a breve raggio, diffondono a distanza attraverso il circolo sanguigno. Attraverso la circolazione questi mediatori infiammatori possono raggiungere siti distali, ed in particolare possono destabilizzare placche aterosclerotiche, con il risultato di precipitare attacchi ischemici e veri e propri episodi infartuali (Lodivici and Bigagli, 2011).

Estratti acquosi del PM<sub>10</sub> raccolto dai filtri di campionamento nella valle dello Utah, contenenti quantità considerevoli di metalli (soprattutto ferro, rame e zinco), sono stati in grado di indurre citotossicità e rilascio di citochine proinfiammatorie (IL-6 e IL-8) *in vitro*, in linee di cellule epiteliali bronchiali umane; l'entità di tali effetti risultava correlata con il contenuto in metalli delle polveri testate (Frampton *et al.*, 1999).

Gli estratti di particolato di motori a benzina e diesel risultano mutageni al test di Ames, come mostrato in diversi

studi (Shi *et al.*, 2010; Valavanidis *et al.*, 2008). Alcuni studi *in vitro* hanno dimostrato anche che il particolato urbano è genotossico in cellule di mammifero, in macrofagi alveolari e nella linea epiteliale polmonare L132, dove è in grado di provocare la formazione di addotti al DNA (Abbas *et al.*, 2011).

È stato inoltre dimostrato che il particolato derivato dalle emissioni diesel è cancerogeno nell'animale e probabilmente cancerogeno per l'uomo. In uno studio di Courter *et al.* (2008) gli estratti di particolato urbano hanno indotto tumori alla pelle in topi da laboratorio Senecar.

#### **4.5.2 Evidenze epidemiologiche**

##### *Effetti acuti*

La maggior parte degli studi epidemiologici che prendono in considerazione gli effetti delle polveri sono studi di esposizione acuta, che valutano l'associazione tra i livelli degli inquinanti nell'aria e variazioni a breve termine registrate in determinati effetti sanitari. I parametri considerati variano da uno studio all'altro e comprendono il livello di mortalità (totale o distinguendo per le diverse cause), il numero di ricoveri ospedalieri, la prevalenza dei sintomi e delle malattie respiratorie e/o cardiovascolari, la prevalenza delle alterazioni della funzionalità polmonare, ecc. (Pope, 2000).

##### *Mortalità*

I primi e più semplici studi sono quelli che hanno valutato gli effetti di episodi di inquinamento ben delimitati nel tempo e con variazioni estreme dei livelli di inquinanti. In Belgio nel 1930 fu registrato il primo grave episodio di inquinamento

atmosferico con formazione di smog a seguito di prolungata inversione termica, successivamente a Donora (Pennsylvania, 1948) e a Londra nel 1952, dove furono registrati circa 4000 decessi. Agli aumenti dei livelli di particolato nell'aria è risultato associato, oltre l'intensificazione degli episodi di mortalità nello stesso giorno e nei giorni seguenti, l'incremento dei ricoveri per cause respiratorie e cardiovascolari.

Dopo i rilevanti eccessi di mortalità osservati a causa degli importanti episodi di inquinamento, molteplici studi condotti in tutto il mondo hanno evidenziato un'associazione tra concentrazione giornaliera di inquinanti e numero di morti (U.S. EPA, 2009). Nel quadro dell'indagine APHEA (*Air Pollution and Health Effects: a European Approach*), un progetto di ricerca multicentrico svolto in due fasi (APHEA-1 e APHEA-2), sono state coinvolte un gran numero di città in Europa (rispettivamente 15 e 32). In APHEA-2 è stato stimato un aumento dello 0.6% nella mortalità per l'incremento di  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  di  $\text{PM}_{10}$ . Un rischio maggiore (0.8%) è stato calcolato nelle città più calde, in cui sono più alti i livelli di  $\text{NO}_2$  (Atkinson *et al.*, 2001). Risultati analoghi derivano da altri studi Europei e da ricerche condotte in Canada e USA. L'NMMAPS è uno studio che ha coinvolto 90 città americane e che ha mostrato un incremento medio dello 0.21% di mortalità in relazione all'aumento di  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  di  $\text{PM}_{10}$  (Katsouyanni *et al.*, 2009).

Un supplemento alla rivista "Epidemiologia e Prevenzione" ha riportato per esteso la metodologia e risultati della "Metanalisi Italiana degli studi sugli effetti a breve termine dell'inquinamento atmosferico, MISA" (Biggeri *et al.*, 2001). Lo studio è stato condotto nell'ambito di un progetto di ricerca nazionale che ha visto la partecipazione di numerose istituzioni e

ricercatori italiani. L'indagine è stata condotta sulla popolazione di otto grandi città italiane (con circa 7 milioni di abitanti) valutando la relazione tra livelli giornalieri degli inquinanti atmosferici (PM<sub>10</sub>, biossido di azoto, anidride solforosa, ossido di carbonio, ozono) ed eventi sanitari rilevanti quali la mortalità (totale, cause cardiache, cause respiratorie) e i ricoveri ospedalieri (cause cardiache e respiratorie) nel periodo 1990-1999. Si è osservata una associazione statisticamente significativa fra ciascuno degli inquinanti studiati e ciascuno degli indicatori sanitari considerati. Fa eccezione l'ozono, che è risultato associato con la mortalità totale e cardiovascolare e con i ricoveri per cause respiratorie. Le stime di rischio sono più elevate per gli esiti respiratori (mortalità, ricoveri) rispetto a quelli cardiaci ed interessano prevalentemente la popolazione più anziana. Prendendo il PM<sub>10</sub> come parametro ambientale di riferimento, per ogni aumento di 10 µg/m<sup>3</sup> di questo inquinante, si è osservato, nel periodo 1995-99, nel complesso delle città considerate, un incremento nel giorno stesso o nel giorno successivo dell'1.3% nella mortalità totale, dell'1.4% nella mortalità cardiovascolare, del 2.1% nella mortalità respiratoria, dello 0.8% nei ricoveri per cause cardiovascolari e dell'1.4% nei ricoveri per cause respiratorie.

Per quanto riguarda il PM<sub>2.5</sub> l'incremento di 10 µg/m<sup>3</sup> è stato associato con un aumento da 0.6 a 1.7% della mortalità giornaliera per tutte le cause, da 0.6 a 6.5% per cause respiratorie e da 0.6 a 2.5% per cause cardiovascolari (Pope and Dockery, 2006; WHO, 2006). In uno studio condotto in USA è stato dimostrato un aumento del 76% della mortalità per cause vascolari in donne della terza età associato ad elevati livelli di particolato fine (Miller *et al.*, 2007).

Nei bambini un incremento di  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  di  $\text{PM}_{2.5}$  determina un aumento del 6.9% della mortalità infantile per tutte le cause (WHO, 2005).

#### *Ricoveri ospedalieri*

Molti studi mostrano una sostanziale associazione tra concentrazione di inquinanti e frequenza giornaliera nei ricoveri ospedalieri, la gran parte dei quali per cause respiratorie sia negli adulti sia nei bambini (Katsouyanni *et al.*, 2009). Mentre gli incrementi sulla mortalità sono di maggiore evidenza nella popolazione anziana, gli effetti associati all'incremento di  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  di  $\text{PM}_{10}$  sui ricoveri ospedalieri per asma sono molto simili nelle stratificazioni per età (Sacks *et al.*, 2011). Un incremento di  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  di  $\text{PM}_{2.5}$  è stato associato con un aumento dell'1.2% di ricoveri ospedalieri per malattie cardiache e del 5.5% di ricoveri per problemi respiratori per individui adulti di età superiore ai 65 anni. Inoltre esposizioni a polveri fini hanno portato ad un eccesso del 3.1% di ricoveri ospedalieri per la patologia polmonare cronica ostruttiva (Dominici *et al.*, 2006).

#### *Sintomi respiratori e funzione polmonare*

Sono molto numerosi gli studi epidemiologici (Pope and Dockery, 2006; Di Giampaolo *et al.*, 2011) che hanno valutato l'associazione tra variazione giornaliera dei sintomi respiratori o della funzione polmonare e inquinamento atmosferico sia in popolazioni di asmatici sia in gruppi di popolazione generale. Mentre i sintomi relativi alle vie respiratorie superiori sembrano non essere correlati con l'inquinamento da polveri, se non in misura lieve e spesso non statisticamente significativa, risultano

invece maggiormente e significativamente correlati i sintomi delle vie respiratorie inferiori e la presenza di tosse, così come l'aggravamento della patologia asmatica. Il grado di associazione osservato è risultato maggiore per i sintomi di interessamento bronchiale specie nei soggetti asmatici. Per questi ultimi si è registrato un aumento dell'uso dei broncodilatatori (Kelly *et al.*, 2011). Evidenze consistenti associano esposizioni acute a PM<sub>2.5</sub> all'aumento del 10% di attacchi d'asma in soggetti asmatici e ad un incremento del 14% sull'uso di corticosteroidi in asmatici (Pope and Dockery, 2006; WHO, 2006).

Studi condotti in diversi paesi hanno evidenziato effetti dell'esposizione acuta a PM<sub>10</sub> e PM<sub>2.5</sub> soprattutto sull'apparato respiratorio dei bambini (WHO, 2005).

Una riduzione nella funzionalità respiratoria associata al PM<sub>10</sub> è stata osservata in bambini sani (di età 7-11 anni) nei Paesi Bassi. L'entità di tale effetto è stato valutato in un ulteriore studio, in cui è stato stimato un aumento del 2.7% nella prevalenza della riduzione della funzionalità respiratoria per ogni incremento di 10 µg/m<sup>3</sup> nella concentrazione di PM<sub>10</sub>. Anche in Inghilterra è stata osservata l'associazione dell'aumento dei livelli di PM<sub>10</sub>, nel periodo invernale, con decrementi notevoli della funzionalità respiratoria in bambini in età scolare (7-13 anni) (Weinmayr *et al.*, 2010). Effetti del PM<sub>10</sub> sulla funzionalità polmonare, con decrementi notevoli (maggiori del 20%) dei parametri respiratori, risultano di maggior entità anche in bambini con sibili respiratori (Peacock *et al.*, 2003).

Le polveri ultrafini, come detto in precedenza, possono raggiungere gli alveoli polmonari dando luogo ad un possibile assorbimento nel sangue con il conseguente coinvolgimento di

distretti periferici e i relativi effetti sulla salute . Sostanziali associazioni all'esposizione di UFP sono state evidenziate per malattie respiratorie croniche come l'asma, la bronchite e l'enfisema (Reich *et al.*, 2008).

Nello studio ULTRA, condotto in tre diversi paesi (Amsterdam, Erfurt, Helsinki) negli anni 1998-2000, sono state seguite 131 persone affette da cardiopatia ischemica: ad Helsinki sia le particelle ultrafini che il PM<sub>2.5</sub> sono risultati associati in modo indipendente ai segni di ischemia miocardica (de Hartog *et al.*, 2003). E' stata evidenziata, inoltre, un'associazione tra esposizione alle polveri ultrafini e morbosità cardiovascolare nella popolazione con patologie cardiache croniche.

Studi su individui asmatici indicano che, come per le polveri fini, sussiste un'associazione tra la presenza di polveri ultrafini ed effetti avversi per la salute respiratoria della popolazione esposta, un incremento di 10 µg/m<sup>3</sup> di PM<sub>1</sub> determina un aumento del 18% di attacchi d'asma (Yu *et al.*, 2000). Gli effetti acuti delle polveri ultrafini sulla salute respiratoria sono più consistenti sugli asmatici adulti, rispetto a quelli in età pediatrica. Gli eventi infiammatori polmonari impiegano alcuni giorni per manifestarsi, è probabile che esista un *lag-time* tra l'esposizione alle polveri ultrafini e la comparsa di effetti acuti respiratori nella popolazione esposta.

### ***Effetti cronici***

Gli studi di esposizione cronica hanno il fine di valutare gli effetti di esposizioni a livelli di inquinanti da bassi a moderati per lunghi periodi e gli effetti cumulativi di esposizioni ripetute a livelli elevati di inquinanti.



### *Mortalità*

I primi tentativi di valutazione dei differenziali di mortalità in relazione ai livelli di inquinamento in aree geografiche diverse sono stati condotti negli anni '80. Tali studi, tuttavia, non potevano tenere conto in modo accurato di altri possibili ed importanti determinanti della mortalità (Archer, 1990). Nonostante ciò, ha generato un grande interesse scientifico uno studio condotto nella Repubblica Ceca che ha riscontrato una forte associazione tra concentrazione ambientale di polveri e mortalità infantile (Bobak *et al.*, 1999).

L'approccio più adeguato per studiare il problema è quello di seguire nel tempo coorti di popolazione residenti in aree geografiche con livelli diversi di inquinamento disponendo di informazioni accurate sui più importanti fattori individuali che regolano la speranza di vita (es. fumo, peso corporeo) e studiare nel tempo i tassi di mortalità.

Dockery *et al.* nel 1993 hanno studiato la mortalità di 8111 adulti residenti in sei città degli Stati Uniti durante il periodo 1974-91. Per ciascuna città erano disponibili dati di inquinamento atmosferico e a livello individuale, erano state raccolte informazioni su diversi potenziali confondenti (sesso, età, abitudine al fumo, livello di istruzione ed esposizione professionale a polveri, fumi o gas). I residenti nelle città con concentrazioni medie annuali più elevate di materiale particolato con diametro  $\leq 2.5 \mu\text{m}$  (PM<sub>2.5</sub>) mostravano, rispetto ai residenti nelle città con livelli inferiori di inquinamento, eccessi di mortalità non statisticamente significativi per tutte le cause, per malattie cardiorespiratorie e per tumore del polmone.

In uno studio successivo, Pope *et al.* (1995) hanno analizzato la mortalità dei 552.000 partecipanti alla seconda

indagine sulla prevenzione dei tumori dell'*American Cancer Society*, seguiti dal 1982 al 1989, in funzione delle concentrazioni di solfati e di PM<sub>2.5</sub> rilevate nel 1980 in numerose aree metropolitane degli Stati Uniti. Anche in questo caso si è osservato un eccesso di mortalità per malattie cardiorespiratorie (+26%) e tumore del polmone (+36%). L'analisi controllava l'effetto di confondimento dovuto a età, sesso, gruppo etnico, fumo di sigarette, sigari o pipa, esposizione a fumo passivo e a cancerogeni professionali, indice di massa corporea, consumo di alcolici e livello di istruzione.

Nel 2002, Pope *et al.* hanno pubblicato i risultati dell'estensione del follow al 1998 della coorte dell'*American Cancer Society*. Un aumento della mortalità per tutte le cause (4%), per malattie cardiopolmonari (6%), e tumore polmonare (8%) è stato associato, a incrementi di 10 µg/m<sup>3</sup> nell'esposizione a PM<sub>2.5</sub>.

In un recente studio è stata valutata l'associazione di esposizione croniche a particolato fine e la mortalità per tumore al polmone in una vasta popolazione di non fumatori. L'aumento di 10 µg/m<sup>3</sup> di PM<sub>2.5</sub> ha determinato l'incremento del 15-27% della mortalità per tumore al polmone non evidenziando differenze nelle stratificazione per sesso e condizione sociale (Turner *et al.*, 2011)

In molti studi analizzati in una recente *review* (Mattison, 2010) è stata riscontrata una forte associazione tra esposizione a miscele di PM<sub>10</sub> e PM<sub>2.5</sub> ed effetti sullo sviluppo fetale, inclusa la morte improvvisa del neonato.

### *Sintomi respiratori e funzione polmonare*

Numerosi studi hanno valutato l'associazione tra esposizione cronica ad inquinanti e malattie o sintomi respiratori o funzione polmonare (Ackermann-Liebrich *et al.*, 1997; Schikowski *et al.*, 2005).

Uno studio longitudinale ha riscontrato una diminuita crescita dei volumi polmonari per l'effetto della esposizione cronica a polveri e a NO<sub>2</sub> (Gauderman *et al.*, 2002). Sono stati associati in modo più frequente con l'inquinamento ambientale i segni di bronchite, come la tosse e il catarro cronico, mentre più controversi sono i risultati per quanto riguarda l'asma bronchiale.

A livello italiano il progetto SIDRIA (Studi Italiani sui Disturbi Respiratori nell'Infanzia e l'Ambiente) ha approfondito lo studio di diversi possibili fattori di rischio, con particolare attenzione al ruolo dell'inquinamento dell'aria per la salute respiratoria dei bambini (Agabiti *et al.*, 1999). In particolare, è stato valutato il ruolo dell'inquinamento da traffico veicolare, attraverso una stima del volume e della tipologia del traffico vicino la residenza dei soggetti, su diversi disturbi respiratori tipici dell'età pediatrica, cercando di distinguere i disturbi di tipo asmatico da quelli di tipo bronchitico. Lo studio è stato condotto in dieci aree del Nord e centro Italia ed ha incluso un campione rappresentativo di 39275 bambini in due classi di età (6-7 e 13-14 anni). Nel sottogruppo di bambini residenti in aree metropolitane è stata osservata una chiara relazione tra il passaggio frequente di veicoli pesanti e diversi disturbi respiratori, con associazione più forte per i soggetti che avevano riferito solo sintomi bronchitici. Associazioni più deboli sono

state osservate in relazione a più generici indicatori di traffico e per i bambini residenti in aree non metropolitane.

A Taiwan l'esposizione a inquinamento da traffico veicolare è risultato associato con l'aumento delle diagnosi di rinite allergica e con un aumento dei casi d'asma in età pediatrica (Guo *et al.*, 2003).

### *Cancro*

Ben pochi sono gli studi tendenti ad associare l'esposizione a PM con effetti cancerogeni. Il primo dato, per quanto limitato, a valenza statistica è riportato da Pope e Dockery (2006) e riguarda l'incremento di tumori polmonari da PM<sub>2.5</sub> osservato in uno studio condotto negli USA. Studi precedenti effettuati negli anni novanta e inizio 2000 non avevano fornito associazioni statisticamente significative.

Il rischio di cancro polmonare legato all'inquinamento da polveri, infatti, presenta numerosi aspetti controversi. Il ruolo preciso dei fattori ambientali nella genesi del cancro al polmone è difficile da valutare, anche per il contributo confondente di altri fattori, come il fumo di sigaretta e le esposizioni professionali, responsabili della maggior parte dei tumori del tratto respiratorio. Tuttavia, l'osservazione che nelle aree urbane il rischio relativo di cancro è maggiore (fino al 46% in più) che nelle aree rurali, suggerisce l'associazione all'inquinamento atmosferico, oltre che a fattori di rischio quali maggiore abitudine al fumo e più frequenti esposizioni professionali.

Gli studi epidemiologici disponibili suggeriscono comunque che il rischio di tumore al polmone attribuibile all'inquinamento atmosferico sia di un eccesso del 5-20% nelle aree urbane a più elevato inquinamento (Clapp *et al.*, 2008).

Inoltre negli USA è stato stimato che circa il 35% dei casi di tumore polmonare correlati all'inquinamento sono attribuibili all'azione del particolato (Vinikoor-Imler *et al.*, 2011).

## CAPITOLO 5

### Materiali e Metodi

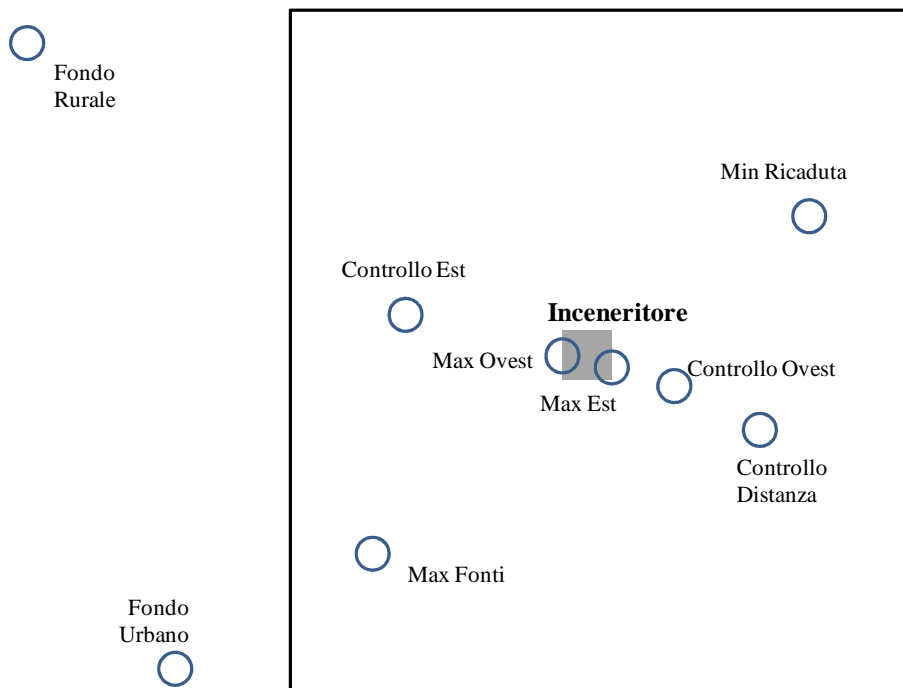
#### 5.1 Campionamenti di PM<sub>2.5</sub>

Il campionamento di PM<sub>2.5</sub> nell'intorno dell'inceneritore è stato realizzato sulla base di un modello matematico di ricaduta delle polveri messo a punto da ARPA-ER.

I punti di campionamento sono stati distribuiti col criterio di seguito descritto (**Fig. 5.1**):

Per il PM<sub>2.5</sub> - 9 punti di campionamento di cui:

- Sito Fondo Urbano, nell'area urbana di Bologna, esterno al dominio di calcolo dell'analisi modellistica;
- Sito Fondo Rurale, esterno al dominio in area rurale;
- 7 punti all'interno del dominio scelto di cui:
  - 2 siti "di massimo" nell'area di maggior impatto del solo inceneritore (Max Ricaduta Est e Max Ricaduta Ovest);
  - 2 siti "di controllo" nell'area esterna all'isolinea di minima ricaduta del solo inceneritore ma con pressione di tutte le altre fonti di emissione simile ai punti di "massimo" (Controllo Est e Controllo Ovest);
  - 1 sito nell'area di massima ricaduta di tutte le fonti di pressione presenti nel dominio (Max Fonti);
  - 1 sito nell'area di minima ricaduta di tutte le fonti di pressione del dominio (Min Ricaduta);
  - 1 sito in un'area in cui, rispetto ad un punto di massima ricaduta dell'inceneritore, è simile la pressione dei confondenti ed è maggiore la distanza dall'inceneritore (Controllo Distanza).



**Figura 5.1:** Schema della disposizione dei punti di monitoraggio, interni ed esterni al dominio di calcolo dell'analisi modellistica.

Sono state effettuate due differenti campagne di monitoraggio, estiva ed invernale, della durata di circa 45 giorni ciascuna:

- Stagione estiva 2008 (13 Giugno – 24 Luglio 2008, giornalmente)
- Stagione invernale 2009 (15 Gennaio – 12 Marzo, giornalmente).

La strumentazione utilizzata è un campionatore automatico sequenziale TCR *Tecora Skypost* costituito da una linea di campionamento riscaldata per microinquinanti corredata di impattore da camino in testa per il frazionamento delle polveri nelle classi granulometriche  $PM > 10 \mu m$ ,  $10 \mu m > PM > 2.5 \mu m$ ,  $PM < 2.5 \mu m$ . La polvere campionata dallo strumento viene depositata per le 24 ore del giorno solare su una membrana

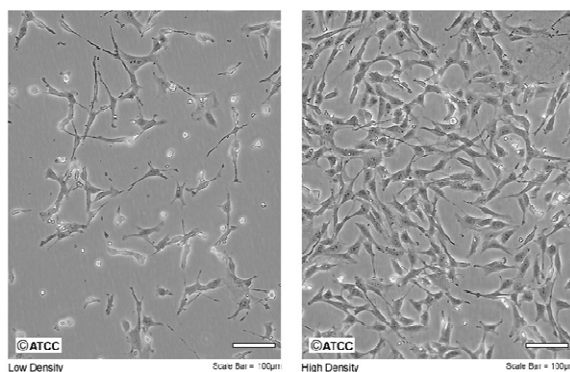
filtrante, precedentemente pesata, in fibra di quarzo. Una volta concluso il campionamento, il filtro viene introdotto in un ambiente condizionato di laboratorio e poi pesato di nuovo, per stabilire quanto particolato ha accumulato. Dalle informazioni sulla massa depositata e sul volume di aria che, nelle 24 ore di campionamento, ha investito il supporto filtrante, si giunge a stabilire la concentrazione media giornaliera di PM.

## 5.2 Colture cellulari

La linea cellulare BALB/c 3T3, clone A31 (**Fig. 5.2**), è stata ottenuta dall'*American Type Culture Collection*, USA, mentre le cellule BALB/c 3T3, clone A31-1-1 (**Fig 5.3**), provengono dalla *Health Science Research Resource Bank* (Osaka, Japan). Le colture di lavoro sono state espanse dallo stock originale, mantenute subconfluenti e utilizzate non oltre il terzo passaggio dopo lo scongelamento. Le cellule sono mantenute in atmosfera modificata al 5% di CO<sub>2</sub> a 37°C, rispettivamente in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) addizionato con 10% di *Newborn Calf Serum* (NCS) e in *Modified Eagle's Medium* (MEM) addizionato con 10% di *Fetal Bovine Serum* (FBS).

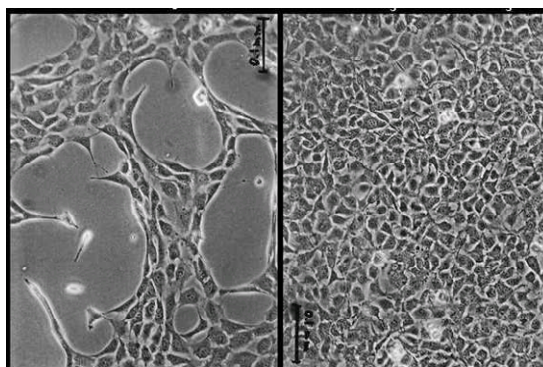


**ATCC CLL-163  
BALB/C 3T3 A31**



**Figura 5.2:** Cellule del clone BALB/c A31 a differenti gradi di confluenza (tratto da [www.atcc.org](http://www.atcc.org)).

**JCRB0601  
BALB/C 3T3 A31-1-1**



**Figura 5.3:** Cellule BALB/c A31-1-1 a differenti gradi di confluenza. Ingrandimento 10x (tratto da [cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcrb0601.htm](http://cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcrb0601.htm))

### **5.3 Preparazione dei campioni per lo studio tossicologico**

#### *Prove preliminari*

Per le prove preliminari (selezione del solvente e del modello cellulare), sono stati utilizzati campioni di PM<sub>2.5</sub> ottenuti da una precedente campagna di monitoraggio effettuata nella stagione invernale 2008 (gennaio-febbraio 2008, giornalmente per 15 giorni) in una postazione di prelievo

localizzata nel comune di Bologna e caratterizzata da elevato traffico veicolare.

Gli estratti organici ottenuti con due diverse metodiche di estrazione, esano-sonicazione e acetone-soxhlet, sono stati portati a secco (presso il RAR Mutagenesi, ARPA ER, sezione di Parma), ripresi con DMSO, un solvente appropriato a garantire la solubilità nel terreno di coltura acquoso, ed esaminati per gli effetti citotossici e l'attività trasformante.

#### *Prove tossicologiche*

Il campionamento di PM<sub>2.5</sub> per le indagini di tossicologia e cancerogenesi è stato effettuato in 4 punti scelti fra i 9 precedentemente descritti. In particolare, i campioni di PM<sub>2.5</sub> sono stati prelevati su filtri di quarzo, giornalmente, nei 4 siti di campionamento di Max Ricaduta Est, Controllo Est, Fondo Urbano e Fondo Rurale.

Nelle tabelle seguenti sono riportate le caratterizzazioni dei filtri relativi alle campagne di monitoraggio estiva (**Tab. 5.1**) ed invernale (**Tab. 5.2**) in termini di volumi di aria campionata, peso delle polveri e concentrazione corrispondenti ai differenti siti di campionamento.

SITO	Volume campionato (m <sup>3</sup> )	Peso polveri (mg)	µg/m <sup>3</sup>
<b>Max ricaduta Est</b>	1245.136	29.051	23.33
<b>Controllo Est</b>	1242.329	26.220	21.11
<b>Fondo urbano</b>	1243.908	23.312	18.74
<b>Fondo rurale</b>	1243.490	17.274	13.89

**Tabella 5.1:** Campagna estiva. Caratterizzazione dei campioni usati nelle analisi tossicologiche.

SITO	Volume campionato (m <sup>3</sup> )	Peso polveri (mg)	µg/m <sup>3</sup>
Max ricaduta Est	1997.810	70.757	35.42
Controllo Est	2104.740	72.558	34.47
Fondo urbano	2106.200	62.264	29.56
Fondo rurale	2101.930	70.132	33.37

**Tabella 5.2:** Campagna invernale. Caratterizzazione dei campioni usati nelle analisi tossicologiche.

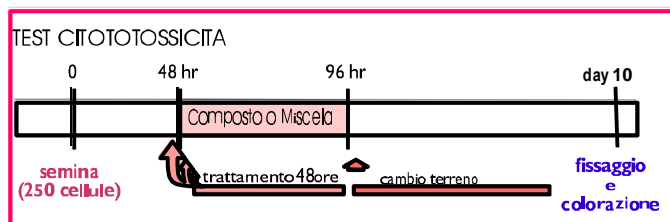
I filtri sono stati estratti come pool con la procedura acetone-soxhlet e portati a secco presso il RAR Mutagenesi, ARPA-ER, sezione di Parma.

Per i test tossicologici, gli estratti organici sono stati ripresi in DMSO, in modo tale da ottenere, per ogni campione, una soluzione di PM corrispondente a 800 m<sup>3</sup> di aria campionata/ml. Le diluizioni seriali finali di trattamento sono state preparate in terreno completo immediatamente prima dell'uso.

#### 5.4 Test di citotossicità

Al fine di saggiare gli effetti citotossici di estratti organici di PM<sub>2,5</sub>, le cellule in fase logaritmica di crescita sono state seminate in piastre Petri da 60 mm Ø ad una densità di 250 cellule/piastra ed incubate nelle condizioni di coltura standard.

A 48 ore dalla semina le cellule sono state esposte per 48 ore all'azione di varie dosi degli estratti (**Fig. 5.4**).



**Figura 5.4:** Protocollo sperimentale utilizzato per gli esperimenti di citotossicità.

Cellule non trattate e cellule trattate con il solo solvente (0.5% DMSO) sono state usate come controlli negativi. Sono state allestite 5 repliche per ciascuna delle concentrazioni previste della miscela in esame.

Al termine del periodo di trattamento è stato effettuato un cambio di terreno, in seguito le cellule sono state mantenute in coltura in presenza di 3 ml di terreno completo per tutta la durata del test.

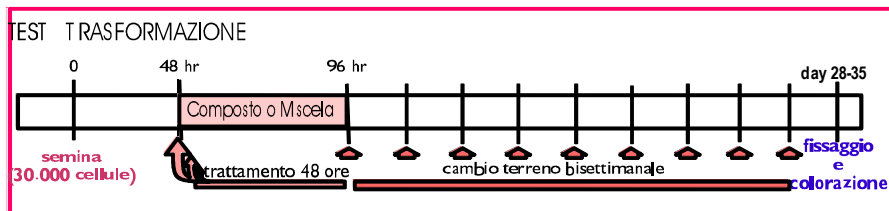
Dopo 10-12 giorni le piastre sono state fissate con metanolo e colorate con Giemsa 10%. In ciascuna piastra sono state contate solo le colonie con più di 50 cellule (IARC/NCI/EPA Working Group, 1985; Franken *et al.*, 2006).

I dati sono stati espressi come numero medio di colonie per piastra  $\pm$  errore standard, efficienza clonale assoluta (ECA), calcolata come rapporto tra numero di cellule in grado di formare colonie e numero di cellule seminate ed efficienza clonale relativa (ECR), espressa in percentuale ed ottenuta dal rapporto tra la media delle colonie nel gruppo di trattamento e quella nel controllo, costituito da cellule trattate con il solo solvente.

## 5.5 Test di trasformazione

Le cellule in crescita esponenziale sono state seminate in piastre da 60 mm Ø ad una densità di  $3 \times 10^4$  cellule/piastra ed incubate a 37°C in atmosfera controllata al 5% di CO<sub>2</sub>.

A 48 ore dalla semina, le cellule sono state esposte alle varie concentrazioni della miscela in esame per la durata di 48 ore (**Fig. 5.5**).

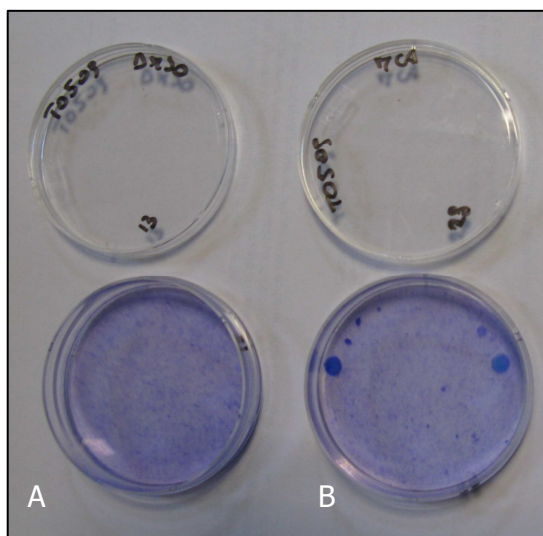


**Figura 5.5:** Protocollo sperimentale utilizzato per gli esperimenti di trasformazione.

L'esperimento prevede l'allestimento di controlli positivi (piastre trattate con 3-MCA) e controlli negativi (cellule non trattate e cellule trattate con il solvente utilizzato per veicolare il controllo positivo e gli estratti di PM<sub>2.5</sub>). La concentrazione finale del solvente è la stessa per tutti i trattamenti.

Sono state allestite 10 repliche per ciascuna delle concentrazioni previste della miscela in esame, per i controlli positivi e negativi.

Al termine del periodo di incubazione, le soluzioni di trattamento sono state rimosse e le cellule mantenute in 3 ml di terreno completo. Il terreno è stato sostituito 2 volte/settimana per tutta la durata dell'esperimento di trasformazione. A cinque settimane dalla semina iniziale, le piastre sono state fissate con metanolo e colorate con una soluzione acquosa di Giemsa al 10% (**Fig. 5.6**); si è poi proceduto alla conta dei *foci*.

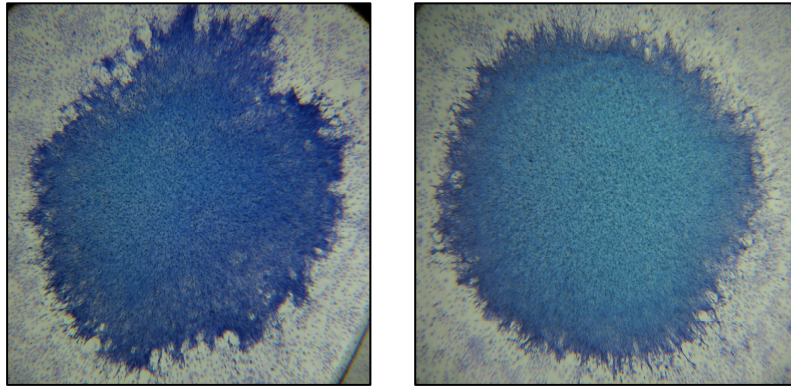


**Figura 5.6:** Piastre di un esperimento di trasformazione.  
A – controllo negativo - cellule trattate con il solvente (DMSO).  
B – controllo positivo - cellule trattate con il cancerogeno (3-MCA).

Parallelamente al test di trasformazione viene condotto un test di citotossicità allo scopo di determinare la frazione di cellule sopravvissuta al trattamento chimico.

### 5.5.1 Stima dell'attività trasformante

Per il riconoscimento dei foci sono state seguite linee guida illustrate nella letteratura scientifica di riferimento (IARC/NCI/EPA Working Group, 1985; OECD, 2007; Hayashi *et al.*, 2008). Sono stati contati soltanto i *foci* definiti positivi (tipo III), ovvero quelli con diametro superiore ad 1 mm, intensamente basofili, costituiti da cellule a disposizione casuale, pluristratificate, con atteggiamento infiltrante nei confronti del monostrato circostante che presenta inibizione da contatto (**Fig. 5.7**). A differenza delle cellule parentali, le cellule isolate da foci tipo III sono tumorigeniche quando inoculate nell'animale (Kakunaga *et al.*, 1985; Colacci *et al.*, 1993).



**Figura 5.7:** *foci* trasformati - cellule trattate con il cancerogeno (3-MCA) (ingrandimento 40x).

L'attività trasformante è stata espressa come: numero medio di *foci* per piastra  $\pm$  errore standard e frequenza di trasformazione (TF), data dal rapporto tra il numero di *foci* per gruppo sperimentale ed il numero delle cellule a rischio, sopravvissute dopo il trattamento con la sostanza in esame, calcolato sulla base della efficienza clonale osservata nel test di citotossicità condotto in parallelo.

### **5.5.2 Criteri di accettabilità del test e di classificazione dei campioni**

I criteri di accettabilità del test sono stati definiti sulla base della letteratura scientifica di riferimento (OECD, 2007; Hayashi *et al.*, 2008; Ohmori *et al.*, 2005; Mascolo *et al.*, 2010; Sakai *et al.*, 2010).

Il test di trasformazione viene considerato valido se:

- il controllo positivo (3-MCA, 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) induce un incremento significativo nella trasformazione cellulare;
- il veicolo del trattamento (controllo solvente, DMSO) non induce un incremento significativo della trasformazione;

- il numero totale dei *foci* trasformati rilevati nelle piastre trattate con il controllo positivo è almeno 2 volte più elevato di quello osservato nelle cellule trattate con DMSO.

I criteri di classificazione sono stati definiti sulla base della letteratura scientifica di riferimento (OECD, 2007; Hayashi *et al.*, 2008; Ohmori *et al.*, 2005; Mascolo *et al.*, 2010; Sakai *et al.*, 2010). Il campione in esame viene considerato positivo quando:

- l'aumento nel numero medio di *foci* per piastra nel gruppo di trattamento è significativo rispetto al controllo solvente al livello di confidenza del 99% per almeno una delle dosi esaminate o al livello di confidenza del 95% per due o più dosi consecutive esaminate;
- l'aumento nella frequenza di trasformazione nel trattato è almeno 2 volte quello del controllo solvente;
- la tossicità indotta dal trattamento non è superiore al 90%, cioè le cellule a rischio sono  $> 10\%$  della popolazione sottoposta al trattamento.

Un campione che soddisfa il primo dei due criteri, ma non il secondo viene considerato non classificabile o equivoco. Un campione che non soddisfa nessuno dei primi due criteri viene considerato negativo. Un campione che soddisfa uno dei primi due criteri, ma non il terzo, viene considerato un falso positivo.

### **5.5.3 Analisi statistica**

Le differenze tra la media delle colonie nel gruppo di trattamento e nel gruppo di controllo sono state analizzate con il



test di Student (t-test). La significatività delle differenze nelle efficienze clonali assolute delle cellule esposte al trattamento chimico rispetto al controllo (cellule trattate con il solo solvente) sono state valutate con il test z per la comparazione di due proporzioni. L'efficienza clonale relativa è stata analizzata con il test del Chi quadrato in tabelle di contingenza 2x2.

La significatività della percentuale di piastre positive rispetto al numero totale di piastre esaminate è stata calcolata mediante il test di Fisher-Yates in tabelle di contingenza 2x2.

L'analisi statistica della distribuzione dei *foci* è stata eseguita con il test di Mann-Whitney (*Mann-Whitney unpaired t test*).

La valutazione statistica delle differenze significative tra le frequenze di trasformazione nei trattati e nel controllo solvente è stata effettuata mediante applicazione del test di comparazione delle frequenze di Poisson, dopo avere verificato che i valori di frequenza di trasformazione seguono una distribuzione di Poisson.

Tramite il test per la regressione lineare Cochran-Armitage è stata evidenziata l'esistenza di una correlazione significativa tra i valori di ECA e TF e le rispettive dosi di trattamento e se tale correlazione risulta lineare in maniera significativa.

I dati di efficienza clonale relativi alle due campagne (estiva ed invernale) sono stati analizzati separatamente in ambiente R basandosi su un modello GLM (*Generalized Linear Models*) con distribuzione di probabilità Beta-Binomiale e funzione legame Logit. In particolare, per valutare l'eventuale effetto della provenienza dell'estratto sul valore di ECR calcolato è stato considerato un modello del tipo  $ECR \sim Dose + Sito +$

DoseSito (dove la componente DoseSito rappresenta l'effetto di interazione tra la dose e il sito). Il test F viene eseguito per valutare se il contributo delle singole componenti del modello sono significative nel determinare una variazione nel valore assunto dalla variabile dipendente ECR.

## **5.6 Analisi trascrizionale**

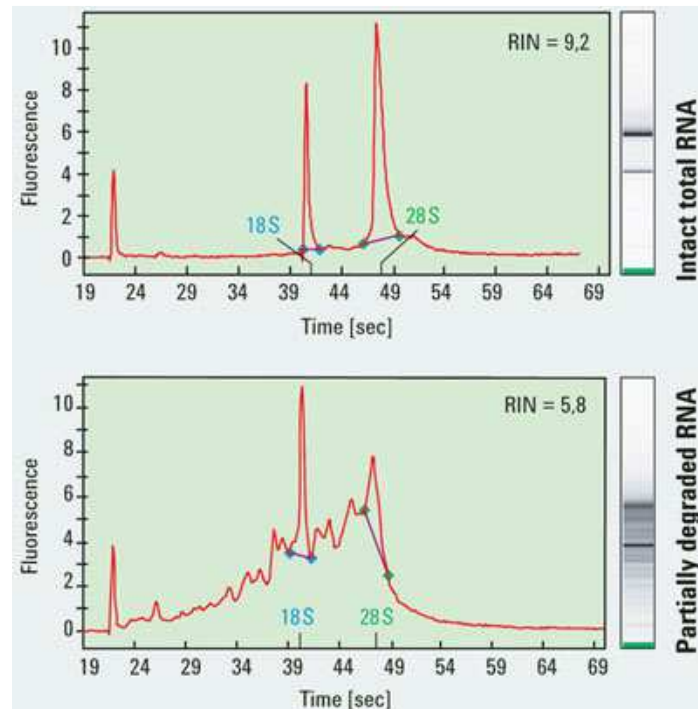
Con il fine di approfondire gli studi tossicologici relativi all'aria campionata in prossimità dell'impianto di trattamento dei rifiuti urbani di Bologna cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 sono state esposte ai campioni di PM<sub>2.5</sub>, estivi ed invernali, relativi ai siti di Max Ricaduta Est, Controllo Est e Fondo Urbano. Sono state allestite per ogni tipologia di trattamento (sito di provenienza/stagione) 3 repliche biologiche, gestite come tali a partire dallo scongelamento delle cellule fino all'estrazione dell'RNA, e successivamente è stato preparato un pool di RNA da testare in microarray in triplicato (repliche tecniche).

### **5.6.1 Estrazione, purificazione, quantificazione e controllo qualità dell'RNA**

Le cellule sono state seminate in piastre Petri da 60 mm Ø e trattate dopo 48h dalla semina. Dopo 4 ore di trattamento, sono stati effettuati 2 lavaggi in PBS. Le cellule sono state lisate direttamente in piastra utilizzando una soluzione monofasica di fenolo acido e guanidina isotiocianato (Trizol). A ciascun campione è stato quindi aggiunto un volume di cloroformio pari ad 1/5 del volume di Trizol utilizzato. Dopo un passaggio al vortex, i campioni sono stati centrifugati per 15' a 13000 rpm per ottenere una separazione in fasi da cui si preleva la fase acquosa contenente l'RNA. Un volume di etanolo 70% pari al volume di fase acquosa ottenuta è stato aggiunto ad ogni campione ed il tutto ulteriormente purificato mediante passaggio su colonna RNeasy mini (RNeasy mini kit, Qiagen). L'RNA di lunghezza superiore a 200 nucleotidi rimane adsorbito sulla membrana di

gel di silice contenuta nella colonna cromatografica, lavato con tamponi forniti nel kit Qiagen, quindi eluito con acqua RNase free 30  $\mu$ l e conservato a -80°C.

La concentrazione dell'RNA estratto è determinata mediante lettura (260 nm) allo spettrofotometro NanoDrop 1000 mentre la qualità viene valutata dall'analisi del profilo elettroforetico mediante Bioanalyzer Agilent 2100, secondo la procedura fornita dal RNA 6000 Nano Assay Kit (Agilent Technologies) specifico per la valutazione dell'RNA totale eucariotico. Ogni RNA LabChip è costituito da un set di microcapillari nei quali viene polimerizzato un gel per la separazione dei frammenti di acido nucleico. Il software di cui è fornito il Bioanalyzer traccia per ciascun campione un profilo elettroforetico dell'intera popolazione di RNA da cui si possono ricavare informazioni su eventuali degradazioni dell'acido nucleico misurando il rapporto delle aree dei picchi corrispondenti all'RNA ribosomale 28S e 18S, e su eventuali contaminazioni date da proteine o DNA (**Fig. 5.8**).



**Figura 5.8:** Elettroferogramma e immagine “gel-like” di RNA intatto di alta qualità (in alto) e parzialmente degradato (in basso). RIN, *RNA Integrity Number*.

## 5.6.2 Marcatura RNA e ibridazione microarray

Il kit sviluppato da Agilent per la marcatura dei messaggeri combina una fase di retrotrascrizione dell’RNA totale a cDNA con una successiva fase di trascrizione *in vitro* a cRNA durante la quale il cRNA viene marcato con una molecola fluorescente costituita da citosin tri-fosfato (CTP) coniugato al fluorocromo cianina 3 (Cy3). Questo processo consente, contemporaneamente alla marcatura del cRNA, una amplificazione lineare dei trascritti che permette di partire da quantità anche molto piccole di RNA totale. Per tutte le fasi del processo che vanno dalla marcatura all’ibridazione sono state seguite le istruzioni presenti nel protocollo agilent G4140-90040\_One-Color\_GE\_5.7. reperibile dal sito di Agilent

([http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90040\\_One-Color\\_GE\\_5.7.pdf](http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G4140-90040_One-Color_GE_5.7.pdf)).

Per tutti i campioni sono stati amplificati gli RNA a partire da 1 µg di RNA totale.

Dopo la marcatura, il cRNA è stato analizzato allo spettrofotometro NanoDrop in modo da valutare sia la quantità del cRNA amplificato (lettura a 260 nm) che l'incorporazione del fluorocromo (lettura a 550 nm). Si considerano accettabili incorporazioni superiori a 9 pmoli di fluorocromo per microgrammo di cRNA amplificato.

Gli oligo microarray sono stati ibridati alla temperatura di 60°C per 17 ore con 1.65 µg di cRNA frammentato, tramite digestione chimica per rendere più efficiente l'appaiamento con la sonda depositata sul vetrino. Sono state utilizzate slide con format 4x44K (**Fig. 5.9**), costituite, cioè, da 4 array contenenti ciascuno 43379 probe, 245 delle quali ripetute 10 volte. Al termine dell'ibridazione i vetrini sono stati lavati per togliere i legami aspecifici e letti allo scanner.

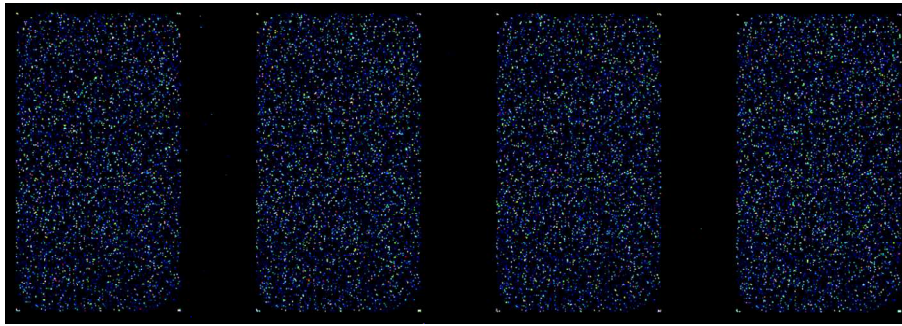


**Figura 5.9:** Gasket slide, format 4x44K, Agilent.

### 5.6.3 Lettura allo scanner e analisi dati

Per la lettura della slide è stato utilizzato il sistema Agilent Microarray Scanner che utilizza un laser per eccitare il fluorocromo Cy3 e misurarne l'intensità di fluorescenza emessa a 570 nm.

L'immagine scansionata (**Fig. 5.10**) è stata analizzata mediante il software di Feature Extraction 9.1 per estrarre il dato delle intensità del segnale relativo a ciascuna sonda.



**Figura 5.10:** Immagine della scansione di una slide 4x44K.

Il programma opera la localizzazione di tutti gli spot sull'array, la definizione della *feature* (area informativa dello spot) e del *background* locale per ciascuno spot, provvedendo poi allo scarto dei pixel con intensità troppo alta o troppo bassa rispetto a una statistica di popolazione dell'intero array.

Insieme a questo dato, il software produce anche un Rapporto di Controllo qualità nel quale, tra i vari parametri, viene riportata la riproducibilità intra-array. Questa viene espressa come mediana del Coefficiente di Variazione (CV) del segnale relativo alle sonde (264) che sono replicate dieci volte all'interno del vetrino.

Per l'analisi dei dati ottenuti si è utilizzato un software dedicato, GeneSpring GX, che fornisce strumenti statistici potenti ed accessibili per una veloce visualizzazione ed analisi dei dati di espressione genica. Il software permette di individuare in modo rapido e affidabile gli obiettivi di interesse da un punto di vista sia biologico che statisticamente significativo. Sviluppato da Avadis™ (Strand Life Sciences), GeneSpring GX è parte della piattaforma fornita da Agilent per i sistemi di analisi trascrizionale.

#### **5.6.4 Interpretazione biologica**

Per la comprensione dei processi attivati dai singoli trattamenti è stato utilizzato l'approccio interpretativo fornito da Pathway Express ([vortex.cs.wayne.edu/projects.htm](http://vortex.cs.wayne.edu/projects.htm)).

Pathway Express integra due tipi di analisi: la prima valuta se i trascritti appartenenti ad un determinato pathway siano significativamente sovra-rappresentati nella lista dei geni modulati in esame, la seconda integra questo dato con le informazioni sull'entità della modulazione del singolo gene e sulla posizione che i geni occupano nell'ambito di un pathway a topologia nota.

Il database di riferimento utilizzato da Pathway Express per l'interpretazione biologica è quello definito e costantemente aggiornato dalla *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) ([www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/)) e consiste in una collezione di mappe geniche curate manualmente che ricoprono la conoscenza attuale sulle interazioni molecolari e i network di reazione.



## 5.7 Valutazione del rischio cancerogeno

La valutazione del rischio cancerogeno indotto dall'inalazione *lifetime* di inquinanti ambientali, in relazione al sito di campionamento, è stata condotta sui dati delle misurazioni gravimetriche di PM<sub>2.5</sub>, IPA, NIPA, diossine e furani e PCB, effettuate da ARPA-ER, nelle due campagne (estiva ed invernale), in base alle potenze relative entro la stessa classe di composti chimici e all'UR di rischio cancerogeno specifico selezionato.

Sono state valutate di questi composti le concentrazioni medie stagionali in aria relative ai due periodi di campionamento, presenti nei PM<sub>2.5</sub>.

Nel caso di valori inferiori al limite di rilevabilità si è utilizzato cautelativamente la metà di tale valore.

Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il test di Student e confrontando le misurazioni effettuate nei siti di massima ricaduta (Max ricaduta Est e Max ricaduta Ovest) con quelle dei relativi siti di minima ricaduta (rispettivamente Controllo Est e Controllo Ovest) e quelle dei siti di Fondo urbano, di Fondo rurale e di massima influenza di tutte le altre fonti (Max fonti).

Per gli IPA e NIPA il valore considerato per la stima del rischio cancerogeno è il valore totale affiancato dal valore trasformato in benzo(a)pirene equivalenti, più informativo.

La potenza cancerogena della miscela è stimata sulla base della somma dei valori trasformati in B(a)P equivalenti di ogni singolo componente.

Per valutare l'effetto cancerogeno di diossine, furani e PCB diossino-simili, è stato utilizzato, il valore trasformato di

ogni singola diossina e di ogni singolo PCB diossino-simile in TCDD equivalenti (TEQ) riferiti alla diossina di Seveso (TCDD) valutata come 1.

Anche per questi composti la potenza cancerogena è stata stimata sulla base della somma dei valori trasformati in TCDD equivalenti di ogni singolo componente.

## **CAPITOLO 6**

### **Risultati**

#### **6.1 Test di trasformazione**

##### **6.1.1 Risultati preliminari**

###### *Selezione del solvente*

Sono state condotte prove comparative, con lo scopo di valutare l'effetto di estratti di particolato urbano preparati con metodologie di estrazione diverse (cicloesano-sonicatore o acetone-Soxhlet) sull'attività citotossica e trasformante di cellule BALB/c 3T3 A31. La necessità del confronto è nata dal fatto che studi tossicologici precedenti erano stati condotti a partire da campioni di PM estratti con cicloesano ([http://www.provincia.bologna.it/ambiente/Engine/RAServeFile.php/f/Progetti/valutazionerischio\\_frullo.pdf](http://www.provincia.bologna.it/ambiente/Engine/RAServeFile.php/f/Progetti/valutazionerischio_frullo.pdf)). Dati ottenuti nel corso dell'attività di monitoraggio della qualità dell'aria, mediante test di Ames dal Laboratorio di Mutagenesi Ambientale ARPA-ER di Parma, indicano però, una limitata attività mutagena a carico di estratti organici apolari rispetto a quelli preparati con solventi a più elevata polarità (diclorometano o acetone).

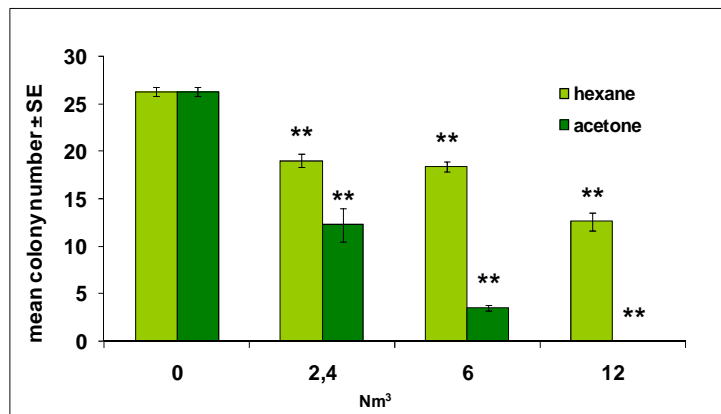
Gli estratti organici ottenuti con diverse metodiche di estrazione (esano-sonicazione e acetone-soxhlet) sono stati portati a secco, ripresi con DMSO e esaminati per gli effetti citotossici e l'attività trasformante.

Tutte e due le modalità di estrazione hanno originato campioni che inducono tossicità dose-relata. Tuttavia l'estratto

organico di PM ottenuto con acetone è risultato più tossico dell'estratto in esano e sono state necessarie dosi inferiori per osservare riduzione dell'efficienza clonale (**Fig. 6.1**).

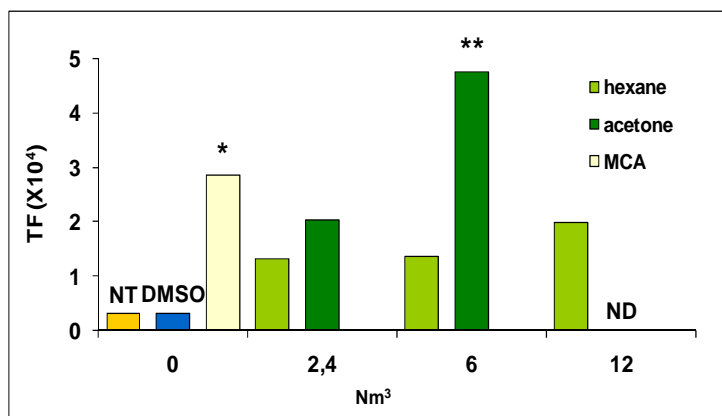
Anche la capacità di indurre formazione di *foci* trasformati sembra essere superiore per gli estratti in acetone e la frequenza di trasformazione è risultata significativamente diversa rispetto al controllo dopo trattamento con l'estratto corrispondente a 6 m<sup>3</sup> di aria campionata/piastra (**Fig. 6.2**).

Dato che lo studio, per necessità di ordine organizzativo dei laboratori coinvolti, è stato condotto con estratti preparati con acetone, la forte tossicità riscontrata nelle linea 3T3 ha reso necessaria una attenta valutazione delle quantità in m<sup>3</sup> da utilizzare per la conduzione dell'attività sperimentale successiva.



**Figura 6.1:** Effetti citotossici (numero medio di colonie/piastra ± errore standard) su BALB/c 3T3 con estratti organici di PM<sub>2,5</sub> di fondo urbano ottenuti con diverse procedure di estrazione.

\*\* p<0.01 vs controllo solvente, t-test.



**Figura 6.2:** Effetti trasformanti (frequenza di trasformazione) su BALB/c 3T3 con estratti organici di PM<sub>2,5</sub> di fondo urbano ottenuti con diverse procedure di estrazione.

\*\* P<0.01 vs controllo solvente, *Poisson rates comparison*.

\* P<0.05 vs controllo solvente, *Poisson rates comparison*.

### *Selezione del modello cellulare*

Lo studio di prevalidazione, concluso di recente, mira a valutare la predittività del test di trasformazione *in vitro* su cellule BALB/c 3T3 nello screening di cancerogenicità delle sostanze chimiche ed è stato condotto con il clone BALB/c 3T3 A31-1-1 (OECD, 2007).

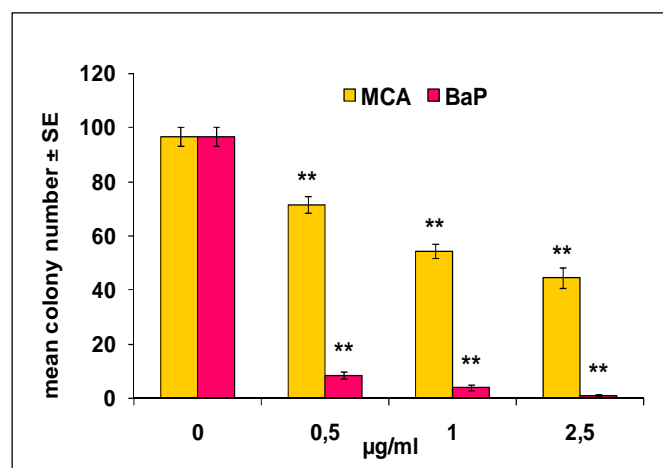
Questa linea è disponibile presso l'*Health Science Research Resource Bank* (Osaka, Japan) e viene attualmente utilizzata nel nostro laboratorio per la valutazione e lo screening di composti chimici.

Sono state condotte alcune prove sperimentali per confermare l'idoneità del clone BALB/c 3T3 A31-1-1 per lo studio di miscele ambientali complesse contenenti sia cancerogeni diretti che indiretti.

Le cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 sono state esposte ad alcuni cancerogeni noti, normalmente usati come controlli positivi nel saggio di trasformazione *in vitro* per determinare la risposta alla esposizione a sostanze chimiche. Sono stati

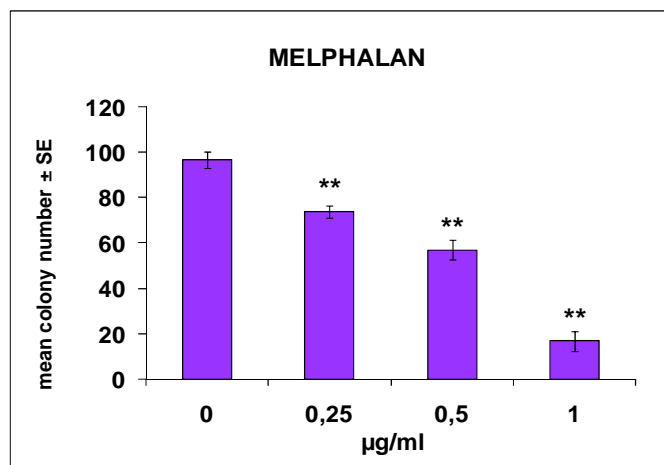
utilizzati, idrocarburi policiclici di riferimento quali 3-MCA e B(a)P, alla concentrazione finale di 2,5 µg/ml; 1,2-Dibromoetano (1,2-DBE) alla concentrazione finale di 50 µg/ml e Melphalan, un agente alchilante bifunzionale, alla concentrazione di 1 µM.

Nel test di citotossicità, le cellule hanno mostrato elevata efficienza clonale e risposta dose-relata agli idrocarburi policiclici aromatici 3-MCA e B(a)P (**Fig. 6.3**) e all'agente alchilante melphalan (**Fig. 6.4**). Il trattamento con 1,2-dibromoetano (1,2-DBE) non ha determinato riduzioni significative nell'efficienza clonale (**Fig. 6.5**).



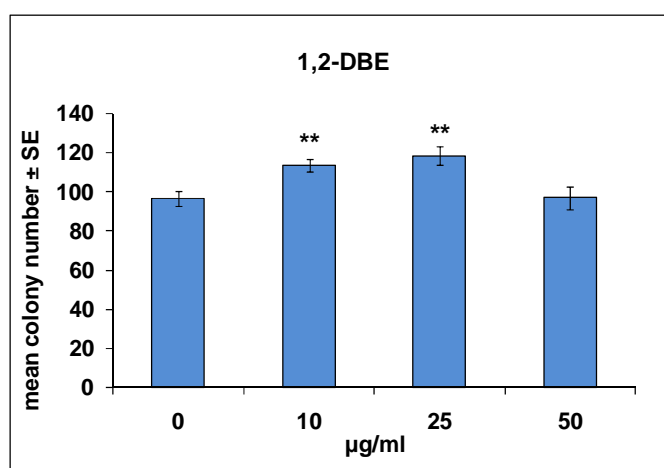
**Figura 6.3:** Citotossicità (numero medio di colonie/piastra ± errore standard) indotta in cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 da 3-MCA e B(a)P.

\*\*  $p < 0.01$  vs controllo solvente, t-test.



**Figura 6.4:** Citotossicità (numero medio di colonie/piastra ± errore standard) indotta in cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 dall'agente alchilante melphalan.

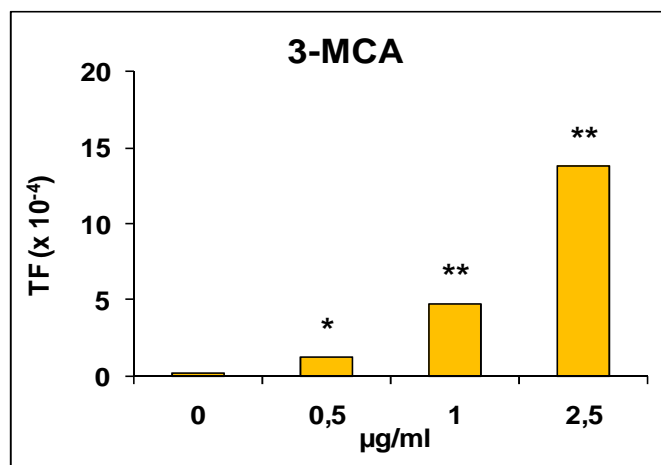
\*\* p<0.01 vs controllo solvente, t-test.



**Figura 6.5:** Citotossicità (numero medio di colonie/piastra ± errore standard) indotta in cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 da 1,2-DBE.

\*\* p<0.01 vs controllo solvente, t-test.

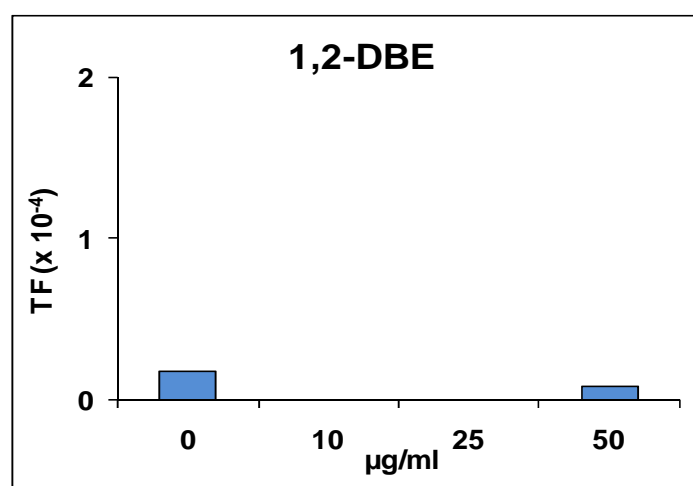
Le cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 sono successivamente state esposte ai cancerogeni noti 3-MCA e 1,2-DBE per valutarne la sensibilità alla trasformazione indotta chimicamente. 3-MCA (*range* di dosi: 0.5-2.5 µg/ml) ha indotto un aumento dose-relato della frequenza di trasformazione (**Fig. 6.6**). 1,2-DBE non sembra in grado di indurre trasformazione in questo sistema sperimentale (**Fig. 6.7**).



**Figura 6.6:** Trasformazione (frequenza di trasformazione) indotta in cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 da 3-MCA.

\*  $p < 0.05$  vs controllo solvente, *Poisson rates comparison*.

\*\*  $p < 0.01$  vs controllo solvente, *Poisson rates comparison*.



**Figura 6.7:** Trasformazione (frequenza di trasformazione) indotta in cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 da 1,2-DBE.

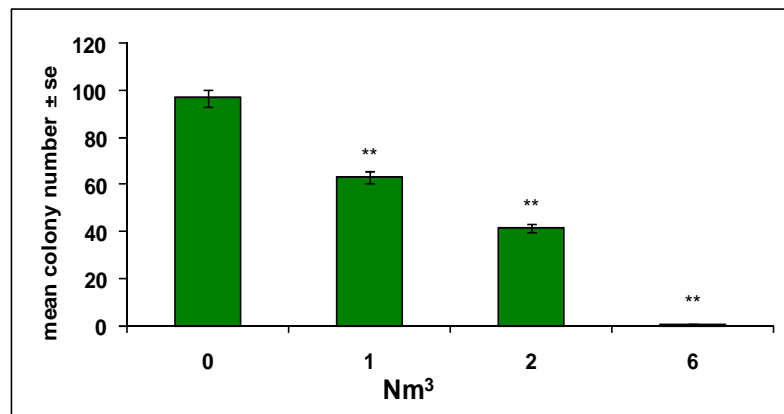
Le cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 sono molto sensibili alla trasformazione chimica e presentano una frequenza di trasformazione spontanea inferiore rispetto al modello BALB/c A31 prima utilizzato, con una riduzione del rischio di false positività. Le cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 sono inoltre molto sensibili alla tossicità e alla trasformazione indotte dagli IPA 3-MCA e B(a)P. Non sembrano invece rispondere in modo



soddisfacente a idrocarburi alifatici bromurati a corta catena come 1,2-DBE. Si può ipotizzare in questa linea cellulare una carenza di attività della GSH-transferasi, enzima deputato alla bioattivazione del 1,2-DBE nel suo metabolita reattivo.

La buona capacità di risposta al 3-MCA, normalmente inserito come controllo positivo nel test di trasformazione, rende le cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 un modello valido per lo studio del profilo tossico e cancerogeno di campioni ambientali contenenti miscele complesse di IPA.

L'elevata citotossicità osservata per gli estratti in acetone di particolato urbano raccolto durante la stagione invernale è stata confermata anche nel clone BALB/c 3T3 A31-1-1 (**Fig. 6.8**).



**Figura 6.8:** Effetti citotossici (numero medio di colonie/piastra ± errore standard) su BALB/c 3T3 A31-1-1 con campioni di PM<sub>2,5</sub> di fondo urbano estratti con acetone.

\*\* p<0.01 vs controllo solvente, t-test.

### 6.1.2 Campagna estiva

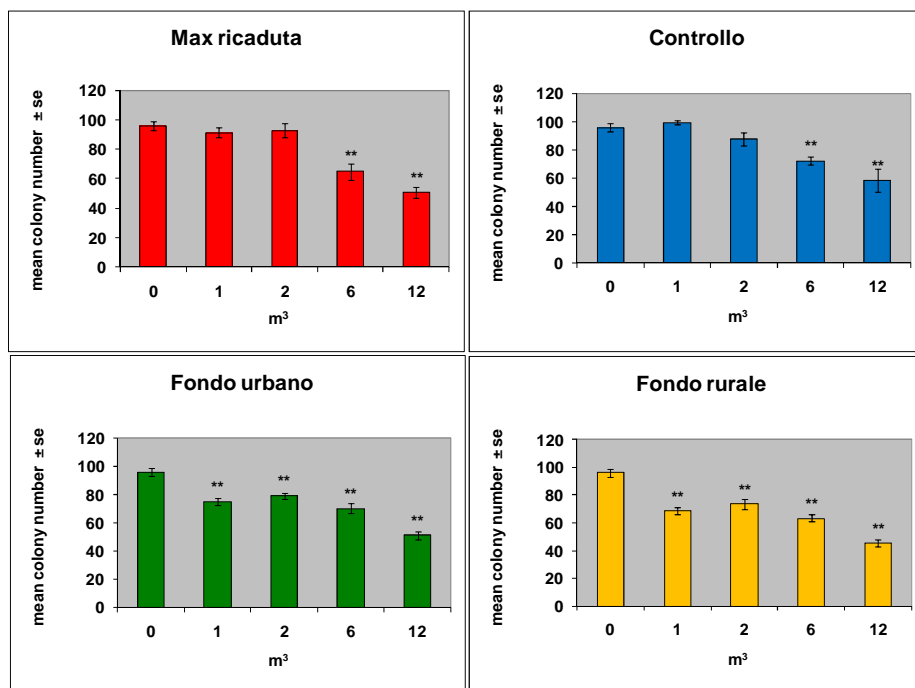
Le cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 sono state trattate con gli estratti di PM<sub>2.5</sub> raccolti durante la campagna estiva (13/06/2008-24/07/2008) nei punti di campionamento selezionati per le indagini tossicologiche.

Le quantità di estratto utilizzate sono corrispondenti a 1-2-6-12 m<sup>3</sup> di aria campionata. Nella **Tabella 6.1** vengono presentate le corrispondenze tra le quantità di estratto con cui sono stati eseguiti i trattamenti nel corso della sperimentazione (esprese in m<sup>3</sup>) e i µg di particolato.

	Max ricaduta (µg/ml)	Controllo (µg/ml)	Fondo urbano (µg/ml)	Fondo rurale (µg/ml)
12 m <sup>3</sup>	93	84	75	56
6 m <sup>3</sup>	47	42	37	28
2 m <sup>3</sup>	16	14	12	9
1 m <sup>3</sup>	8	7	6	5

**Tabella 6.1:** Campagna estiva. Caratterizzazione dei campioni usati nelle analisi tossicologiche.

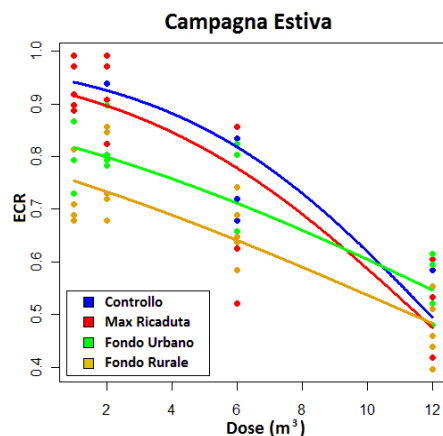
Nel **test di citotossicità**, tutti i campioni raccolti durante la campagna estiva determinano una riduzione dell'efficienza clonale di cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 dopo trattamento con le dosi più alte utilizzate, corrispondenti a 6 e 12 m<sup>3</sup>. Il numero medio di colonie risulta ridotto in modo significativo anche dopo trattamento con le dosi più basse saggiate (1 e 2 m<sup>3</sup>) degli estratti di PM<sub>2.5</sub> prelevati nei siti Fondo Urbano e Fondo Rurale. (**Fig. 6.9**).



**Figura 6.9:** Campagna estiva. Effetti citotossici (numero medio di colonie  $\pm$  errore standard) indotti da estratti di  $PM_{2.5}$ .

\*\*  $p < 0.01$  vs controllo solvente, t-test.

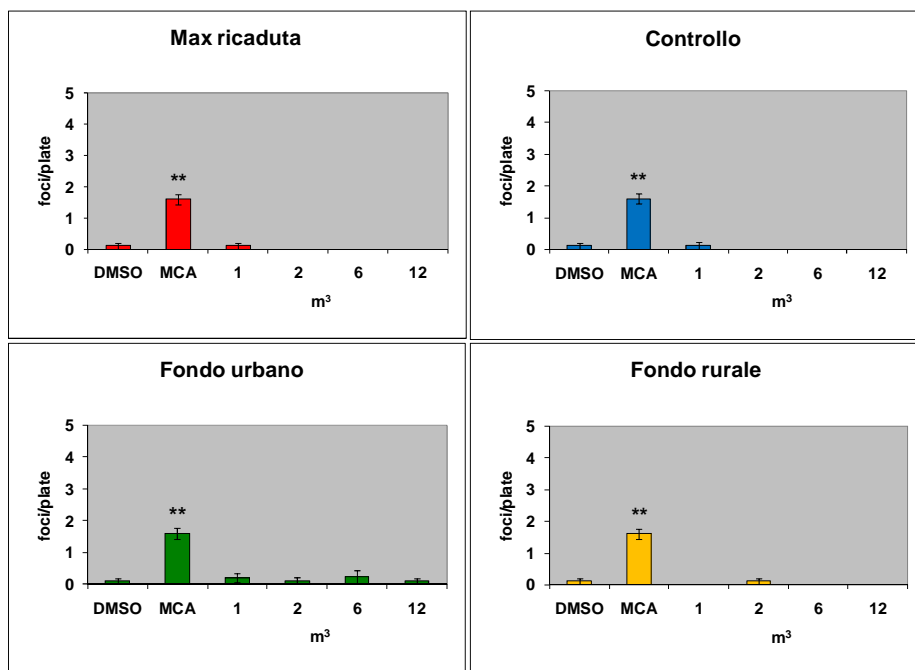
Per valutare l'eventuale effetto della provenienza dell'estratto sul valore di ECR calcolato è stato considerato un modello del tipo  $ECR \sim Dose + Sito + DoseSito$ . Per quanto riguarda il dato dell'efficienza clonale relativo alla campagna estiva il contributo del fattore associato al sito di provenienza dell'estratto è risultato molto significativo (F test: p-value  $< 0.001$ ). Di conseguenza, nell'intervallo di dosi considerato, si può escludere l'ipotesi che la risposta media all'estratto sia la stessa (a parità di  $m^3$ ) indipendentemente dal sito di provenienza dell'estratto (**Fig. 6.10**).



**Figura 6.10:** Campagna estiva. Rappresentazione dei dati sperimentali (punti) e delle curve associate al modello su cui si è basata l'analisi. ECR = efficienza clonale relativa.

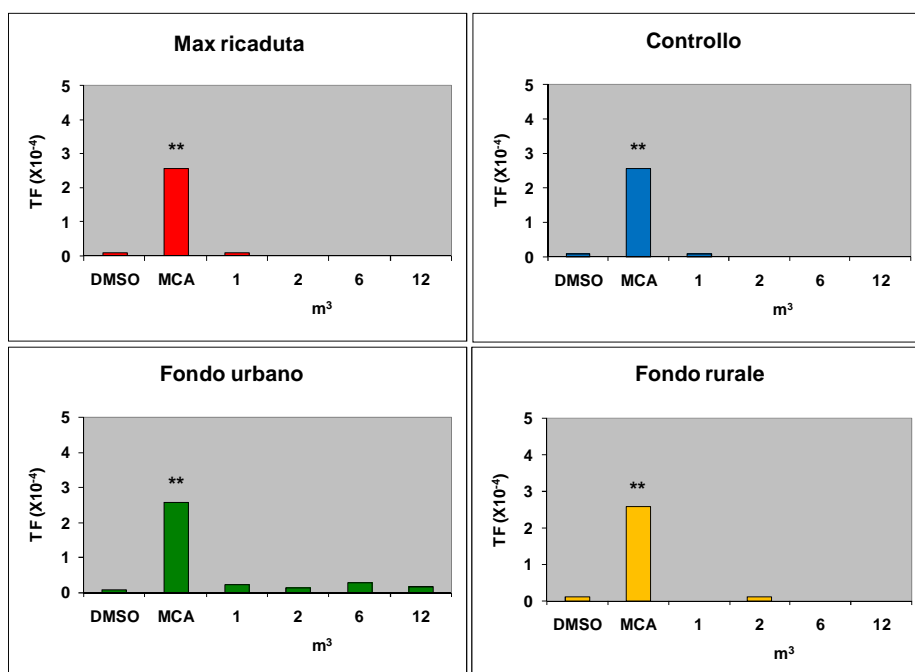
Il **test di trasformazione** condotto con i campioni della campagna estiva è stato considerato valido. Infatti il controllo positivo (3-MCA, 2.5 µg/ml) ha indotto un incremento significativo nella trasformazione cellulare (10 piastre positive/10 piastre totali, 16 *foci*), mentre il veicolo (DMSO) non ha indotto un incremento significativo della trasformazione (1 piastra positiva/10 piastre totali, 1 *focus*); inoltre il numero totale dei *foci* trasformati rilevati nelle piastre trattate con il controllo positivo è almeno 2 volte più elevato di quello osservato nelle cellule trattate con DMSO.

Nessuno degli estratti di PM<sub>2.5</sub> ha indotto un incremento significativo del numero medio di *foci* trasformati/piastra (**Fig. 6.11**) o della frequenza di trasformazione (**Fig. 6.12**) rispetto alle cellule trattate solo con il veicolo. Sulla base dei criteri definiti nel capitolo Materiali e Metodi, i campioni esaminati sono stati considerati negativi, ovvero non in grado di indurre trasformazione cellulare *in vitro* nel modello BALB/c 3T3 A31-1-1.



**Figura 6.11:** Campagna estiva. Effetti trasformanti (*foci*/piastra  $\pm$  errore standard) indotti da estratti di  $PM_{2.5}$ .

\*\*  $p < 0.01$  vs controllo solvente, *Mann Whitney unpaired t-test*.



**Figura 6.12:** Campagna estiva. Effetti trasformanti (frequenza di trasformazione) indotti da estratti di  $PM_{2.5}$ .

\*\*  $p < 0.01$  vs controllo solvente, *Poisson rates comparison*.

### 6.1.3 Campagna invernale

Le cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 sono state trattate con gli estratti di PM<sub>2.5</sub> raccolti durante la campagna invernale (15/01/2009-12/03/2009) nei punti di campionamento selezionati per le indagini tossicologiche.

Le quantità di estratto utilizzate sono corrispondenti a 1-2-6-12 m<sup>3</sup> di aria campionata.

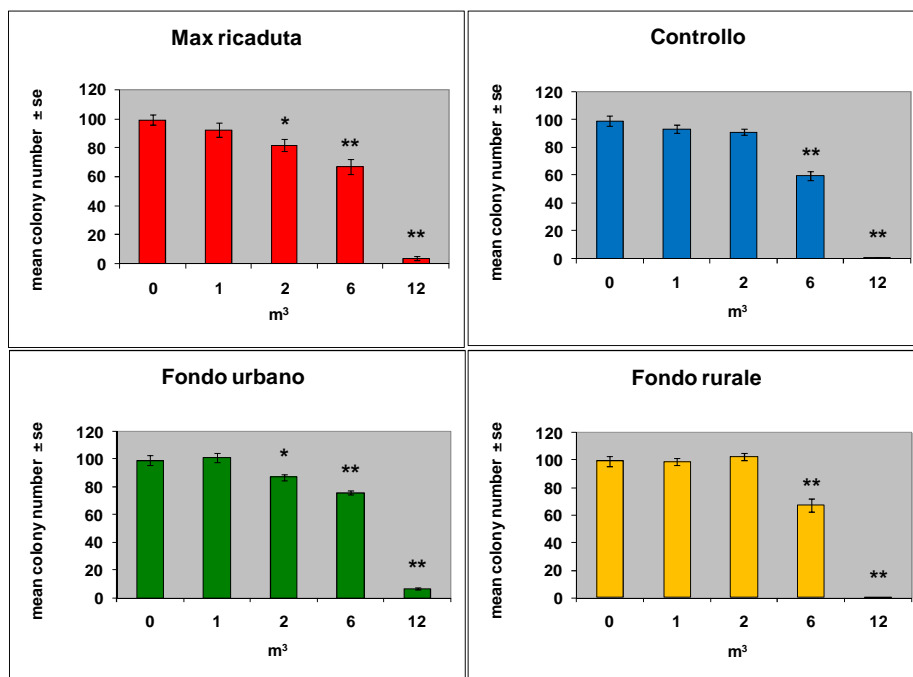
Nella **Tabella 6.2** vengono presentate le corrispondenze tra le quantità di estratto con cui sono stati eseguiti i trattamenti nel corso della sperimentazione (espresse in m<sup>3</sup>) e i µg di particolato.

Sono stati testati per gli effetti cancerogeni due *range* di concentrazioni.

	Max ricaduta (µg/ml)	Controllo (µg/ml)	Fondo urbano (µg/ml)	Fondo rurale (µg/ml)
12 m <sup>3</sup>	142	138	118	133
6 m <sup>3</sup>	71	69	59	67
2 m <sup>3</sup>	24	23	20	22
1 m <sup>3</sup>	12	11	10	11

**Tabella 6.2:** Campagna invernale. Caratterizzazione dei campioni usati nelle analisi tossicologiche.

Nel **test di citotossicità**, gli estratti organici di particolato urbano raccolto nella stagione invernale hanno indotto significativi effetti citotossici sulle cellule BALB/c 3T3 A31-1-1. Nel test presentato in **Figura 6.13**, tutte le dosi di estratto saggiate (1-2-6-12 m<sup>3</sup>) hanno determinato una riduzione significativa del numero medio di colonie/piastra indipendentemente dal sito di provenienza.



**Figura 6.13:** Campagna invernale. Effetti citotossici (numero medio di colonie  $\pm$  errore standard) indotti da estratti di PM<sub>2.5</sub>.

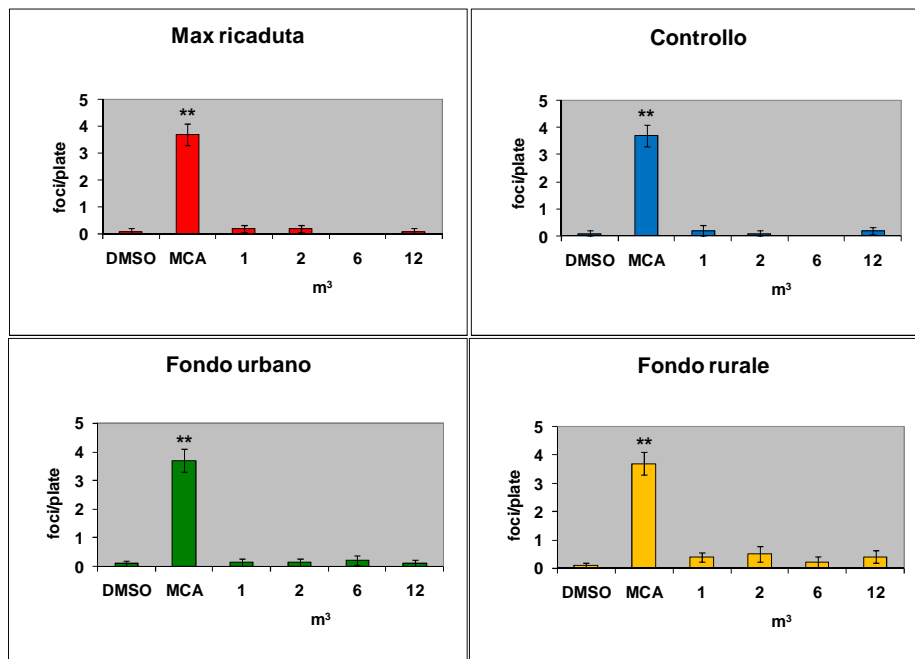
\*  $p < 0.05$  vs controllo solvente, t-test.

\*\*  $p < 0.01$  vs controllo solvente, t-test.

Secondo i criteri di accettabilità, il **test di trasformazione** eseguito con i campioni relativi alla campagna invernale è stato considerato valido. Il controllo positivo (3-MCA, 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) ha indotto un incremento significativo nella trasformazione cellulare (10 piastre positive/10 piastre totali, 37 *foci*), mentre il veicolo (DMSO) non ha indotto un incremento significativo della trasformazione (1 piastra positiva/10 piastre totali, 1 *focus*); inoltre il numero totale dei foci trasformati rilevati nelle piastre trattate con il controllo positivo è almeno 2 volte più elevato di quello osservato nelle cellule trattate con DMSO.

Il trattamento con gli estratti di PM<sub>2.5</sub> invernali non ha indotto alcun incremento significativo nel numero medio di *foci*/piastra (**Fig. 6.14**). Sulla base dei criteri definiti nel capitolo

Materiali e Metodi, i campioni invernali sono stati perciò considerati tutti negativi, ovvero non in grado di indurre trasformazione cellulare *in vitro* nel modello BALB/c 3T3 A31-1-1.

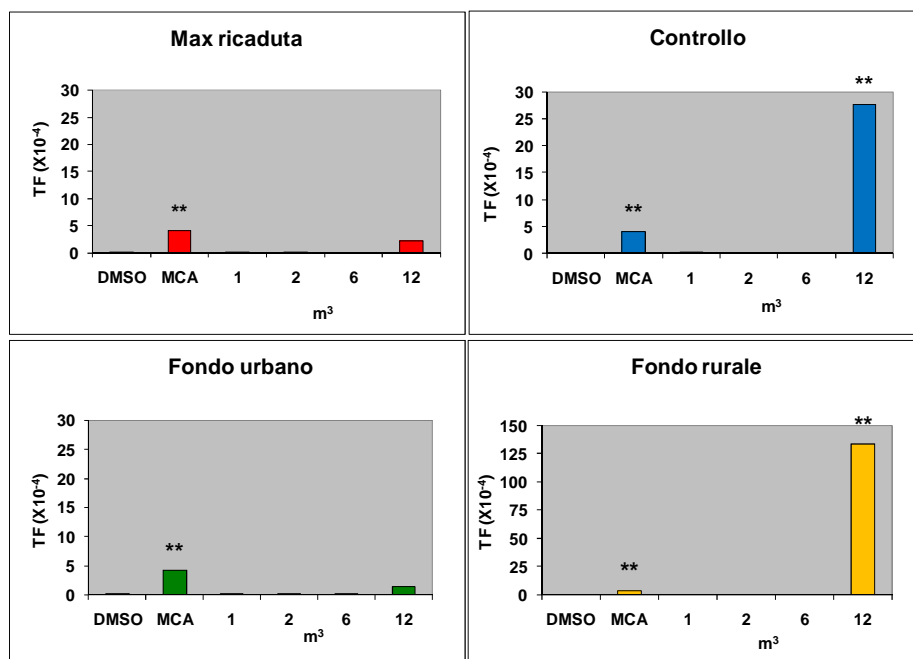


**Figura 6.14:** Campagna invernale. Effetti trasformanti (*foci*/piastra  $\pm$  errore standard) indotti da estratti di PM<sub>2.5</sub>.

\*\*  $p < 0.01$  vs controllo solvente, *Mann Whitney unpaired t-test*.

Per alcuni campioni, in particolare gli estratti del Controllo e del Fondo Rurale alla dose più alta utilizzata (12 m<sup>3</sup>), sono state calcolate frequenze di trasformazione molto elevate e significativamente diverse rispetto a quella calcolata per il controllo solvente (**Fig. 6.15**).





**Figura 6.15:** Campagna invernale. Effetti trasformanti (frequenza di trasformazione) indotti da estratti di PM<sub>2.5</sub>.

\*\* p<0.01, vs controllo solvente, *Poisson rates comparison*.

Alla dose 12 m<sup>3</sup> la tossicità indotta dal trattamento è superiore al 90%, quindi le cellule a rischio sono meno del 10% della popolazione sottoposta al trattamento. In questi casi la probabilità di falsi positivi è molto elevata.

Per confermare la negatività dei campioni invernali nel test di trasformazione *in vitro*, il test è stato ripetuto focalizzando l'attenzione sull'intervallo di dosi più elevato (6-8-10-12 m<sup>3</sup>).

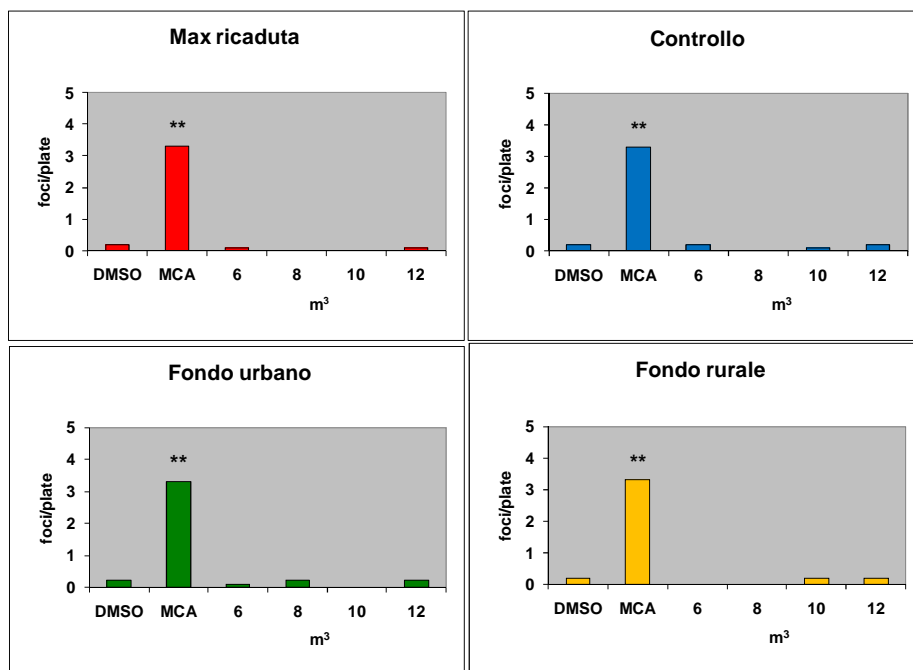
Nella **Tabella 6.3** sono riportate le corrispondenze tra le tra le quantità di estratto con cui sono stati eseguiti i trattamenti (espresse in m<sup>3</sup>) e i µg di particolato.

	<b>Max ricaduta</b> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<b>Controllo</b> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<b>Fondo urbano</b> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<b>Fondo rurale</b> ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>12 m<sup>3</sup></b>	142	138	118	133
<b>10 m<sup>3</sup></b>	118	115	99	111
<b>8 m<sup>3</sup></b>	94	92	79	89
<b>6 m<sup>3</sup></b>	71	69	59	67

**Tabella 6.3:** Campagna invernale. Caratterizzazione dei campioni usati nelle analisi tossicologiche.

Secondo i criteri di accettabilità, anche in questo caso il test di trasformazione è stato considerato valido. Il controllo positivo (3-MCA, 2.5  $\mu\text{g/ml}$ ) ha indotto un incremento significativo nella trasformazione cellulare (10 piastre positive/10 piastre totali, 33 *foci*), mentre il veicolo (DMSO) non ha indotto un incremento significativo della trasformazione (1 piastra positiva/10 piastre totali, 2 *foci*); inoltre il numero totale dei *foci* trasformati rilevati nelle piastre trattate con il controllo positivo è almeno 2 volte più elevato di quello osservato nelle cellule trattate con DMSO.

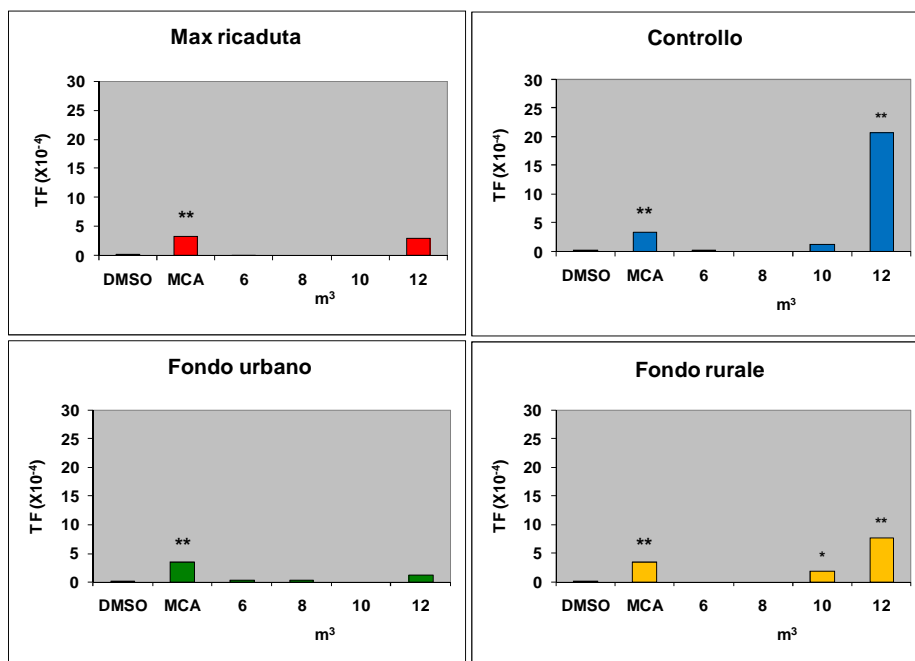
Dopo trattamento con gli estratti di PM<sub>2.5</sub> invernali nell'intervallo di dosi 6-12 m<sup>3</sup> non è stato possibile mettere in evidenza alcun incremento significativo nell'induzione di trasformazione cellulare *in vitro* nel modello BALB/c 3T3 A31-1-1 (**Fig. 6.16**).



**Figura 6.16:** Campagna invernale. Effetti trasformanti (*foci/piastra*  $\pm$  errore standard) indotti da estratti di  $PM_{2.5}$ .

\*\*  $p < 0.01$  vs controllo solvente, *Mann Whitney unpaired t-test*.

Anche in questo esperimento le frequenze di trasformazione calcolate per il campione di Controllo alla dose più alta utilizzata ( $12 \text{ m}^3$ ) e del Fondo Urbano (per le dosi 10 e  $12 \text{ m}^3$ ) sono molto elevate e significativamente diverse rispetto a quella calcolata per il controllo solvente (**Fig. 6.17**).

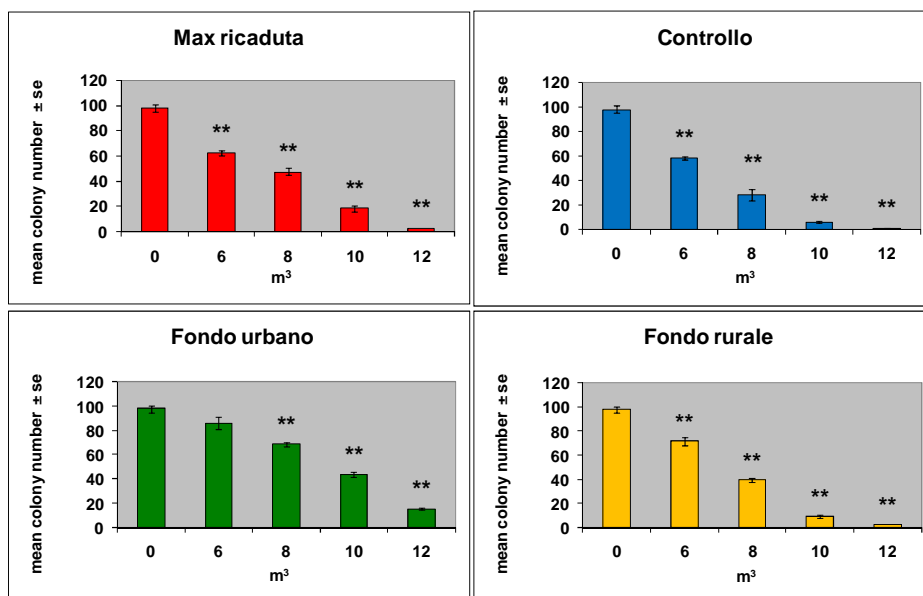


**Figura 6.17:** Campagna invernale. Effetti trasformanti (frequenza di trasformazione) indotti da estratti di PM<sub>2.5</sub>.

\* p<0.05 vs controllo solvente, *Poisson rates comparison*.

\*\* p<0.01 vs controllo solvente, *Poisson rates comparison*.

Si tratta in tutti i casi di dosi che determinano un effetto citotossico superiore al 90%, dove le cellule a rischio sono meno del 10% della popolazione sottoposta al trattamento (**Fig. 6.18**).



**Figura 6.18:** Campagna invernale. Effetti citotossici (numero medio di colonie  $\pm$  errore standard) indotti da estratti di  $PM_{2.5}$ .

\*  $p < 0.05$  vs controllo solvente, t-test.

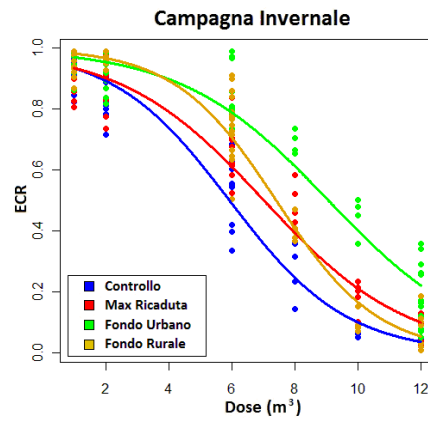
\*\*  $p < 0.01$  vs controllo solvente, t-test.

Le elevate frequenze di trasformazione osservate possono perciò essere considerate come falsi positivi.

Sulla base dei criteri definiti nel capitolo Materiali e Metodi, il giudizio di negatività sui campioni invernali viene confermato.

Considerando tutti i dati derivanti degli esperimenti di citotossicità ottenuti a partire dagli estratti invernali, è stato poi valutato l'eventuale effetto della provenienza dell'estratto sul valore di ECR calcolato, considerando un modello del tipo  $ECR \sim Dose + Sito + DoseSito$ . Nella campagna invernale il contributo del fattore associato al sito di provenienza dell'estratto è risultato molto significativo (F-test: p-value  $< 0.001$ ). Di conseguenza, nell'intervallo di dosi considerato, si può escludere l'ipotesi che la risposta media all'estratto sia la stessa (a parità di

m<sup>3</sup>) indipendentemente dal sito di provenienza dell'estratto (**Fig. 6.19**).



**Figura 6.19:** Campagna invernale. Rappresentazione dei dati sperimentali (punti) e delle curve associate al modello su cui si è basata l'analisi. ECR = efficienza clonale relativa.

## 6.2 Analisi trascrizionale

L'analisi tossicogenomica proposta in questo studio ha valutato l'effetto dell'esposizione ad estratti di PM<sub>2.5</sub> nella linea cellulare BALB/c 3T3 A31-1-1 con il fine di approfondire gli studi tossicologici relativi all'aria campionata in prossimità dell'impianto di trattamento dei rifiuti urbani di Bologna.

### 6.2.1 Disegno sperimentale

Un esperimento di microarray applicato allo studio dell'espressione genica ha come oggetto l'analisi di migliaia di geni contemporaneamente. Considerato l'elevato numero di informazioni derivabili da un singolo esperimento è molto importante l'utilizzo di strumenti statistici adeguati che devono essere supportati da un corretto disegno sperimentale.

In questo studio, oltre alla fase di campionamento del PM<sub>2.5</sub>, la maggiore fonte di variabilità è da individuare nella manipolazione delle cellule e nel loro trattamento che si riflette in una differente risposta cellulare all'insulto tossico. È stato, perciò, deciso di replicare in maniera completamente indipendente queste fasi, scegliendo solo 3 punti di campionamento (Max Ricaduta Est, Controllo Est e Fondo Urbano), una sola dose e un solo tempo di trattamento. La dose impiegata, selezionata sulla base dei dati di citotossicità degli estratti testati, corrisponde all'estratto di PM<sub>2.5</sub> contenuto in 8 m<sup>3</sup> di aria campionata.

Nella **Tabella 6.4** sono riportati i valori in µg/ml di particolato corrispondenti a 8 m<sup>3</sup> per ciascuno dei trattamenti impiegati per l'analisi trascrizionale.

	<b>Max ricaduta</b> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<b>Controllo</b> ( $\mu\text{g/ml}$ )	<b>Fondo urbano</b> ( $\mu\text{g/ml}$ )
<b>estate</b>	62.22	56.28	49.98
<b>inverno</b>	94.44	91.93	78.83

**Tabella 6.4:** Valori in  $\mu\text{g/ml}$  di particolato corrispondenti a  $8 \text{ m}^3$ , per ciascuno dei trattamenti impiegati nell'analisi trascrizionale.

La scelta del tempo di trattamento si è invece basata su dati di letteratura (Sen *et al.*, 2007) che dimostrano come dopo 4-6 ore di esposizione a miscele ambientali complesse è possibile, in molti sistemi cellulari, misurare una risposta trascrizionale consistente e rappresentativa della risposta acuta della cellula all'insulto tossico.

Il disegno sperimentale (**Fig. 6.20**) è stato articolato nell'allestimento di 3 repliche biologiche, gestite come tali a partire dallo scongelamento delle cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 fino all'estrazione dell'RNA, e nella successiva preparazione di un pool di RNA da testare in microarray in triplicato (repliche tecniche).



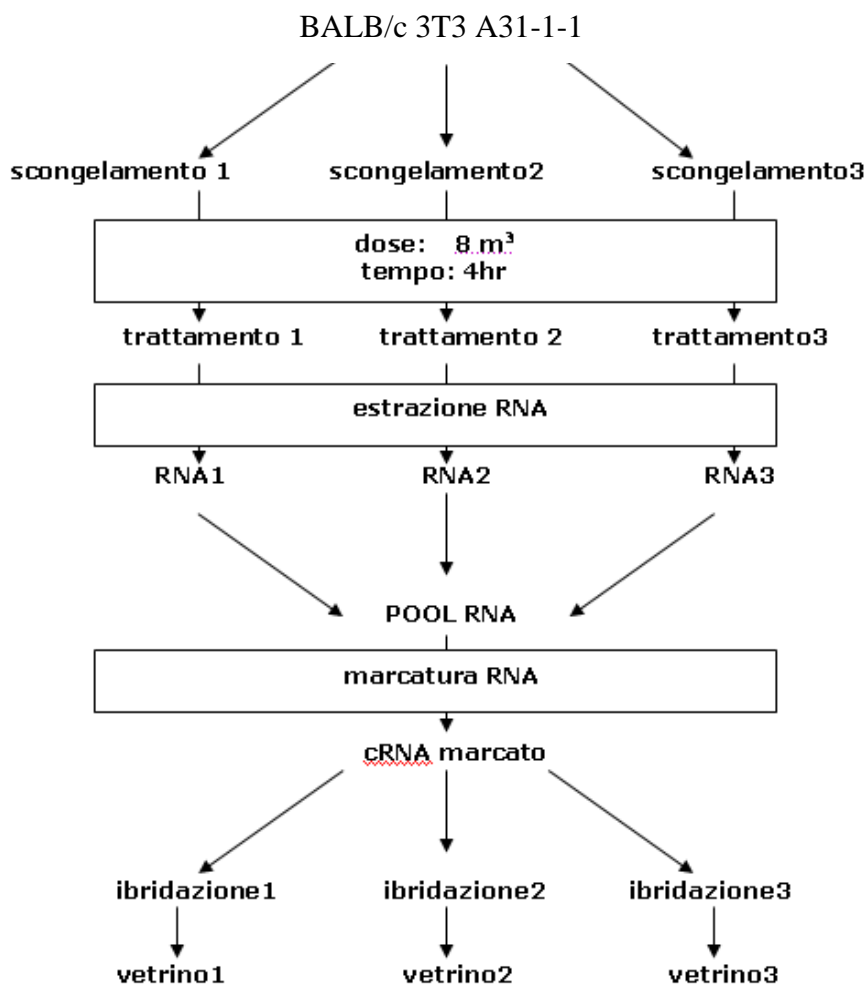


Figura 6.20: Disegno sperimentale.

## 6.2.2 Riproducibilità tecnica

Ciascuna immagine prodotta dalla scansione dei vetrini di microarray è stata analizzata dal software Feature Extraction 9.1 (Agilent) per estrarre dall'immagine il dato delle intensità del segnale relativo a ciascuna sonda. Insieme a questo dato, il software produce anche un Rapporto di Controllo qualità nel quale, tra i vari parametri, viene riportata la riproducibilità intra-array. Questa viene espressa, in percentuale, come mediana del coefficiente di variazione del segnale relativo alle sonde (264)

che sono replicate dieci volte all'interno del vetrino. Nei vetrini microarray relativi allo studio questa percentuale è risultata sempre essere conforme e al di sotto del limite di accettabilità (stabilita a priori da Agilent, pari all'8%).

Per quanto riguarda, invece, la riproducibilità inter-array, cioè tra array replicati, il coefficiente di correlazione del segnale processato (sottratto del background e normalizzato) è in generale molto alto mentre il coefficiente di variazione mediano delle singole sonde si trova sempre al di sotto del limite di accettabilità pari al 10%.

### **6.2.3 Analisi statistica**

Dopo filtrazione dei dati relativi a ciascun gene sia per intensità che per qualità del segnale in modo da eliminare i dati più rumorosi, si è effettuata un'analisi statistica degli effetti indotti dal particolato urbano in esame utilizzando due approcci "*All samples analysis*" e "*Two-sample analysis*".

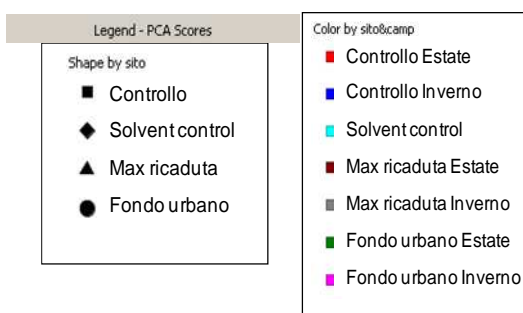
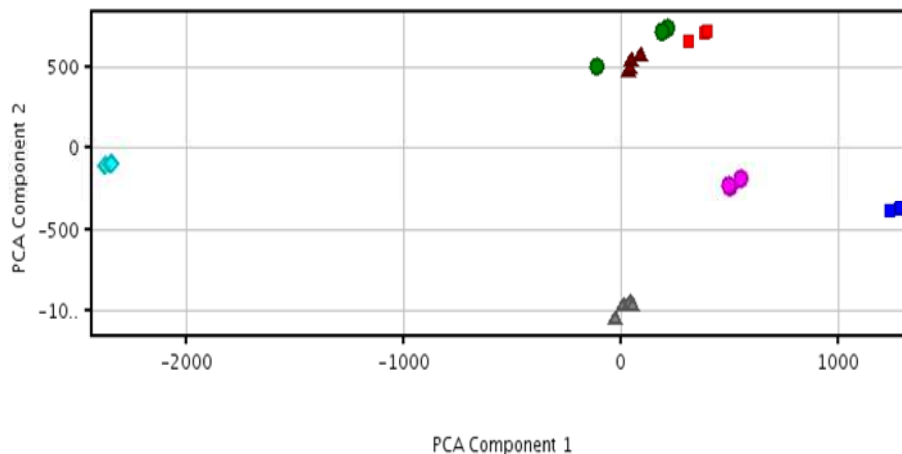
#### *All samples analysis*

Nella "*All samples analysis*" è stato analizzato il risultato degli esperimenti di microarray nella maniera più generale possibile, con lo scopo di individuare le differenze e le somiglianze tra i diversi trattamenti. Sono stati identificati i geni i cui livelli di espressione risultano differenti tra le varie condizioni di trattamento utilizzando come strumento statistico One-way ANOVA (*ANalysis Of Variance*).

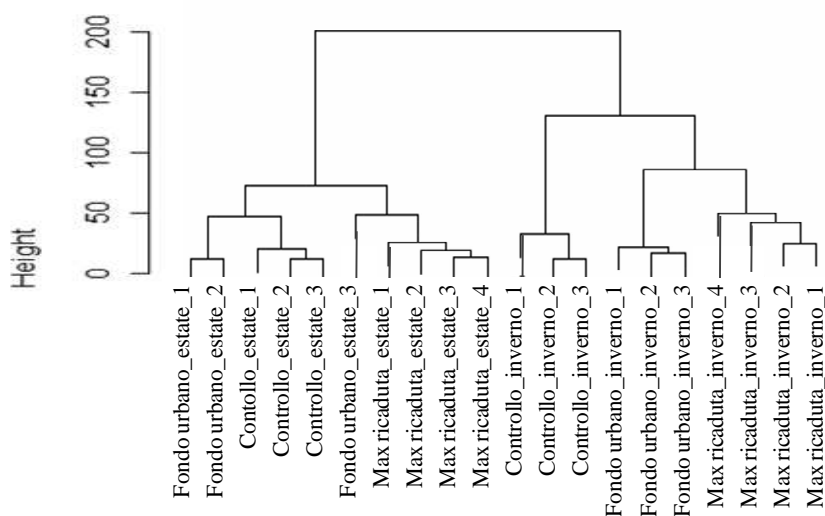
In questa fase di analisi, è stata valutata l'espressione di alcuni dei principali marcatori di risposta a miscele ambientali complesse in modo da indagare la sensibilità della linea cellulare

al trattamento con PM.

Il profilo di espressione dei geni identificati tramite ANOVA ( $p < 0.01$ , Bonferroni) è stato utilizzato per ricavare, tramite PCA (*Principal Component Analysis*), le componenti principali che meglio descrivono gli effetti dei trattamenti. L'analisi One-Way ANOVA ( $p < 0.01$ , Bonferroni) ha identificato 9446 geni il cui livello di espressione varia in risposta ai trattamenti presi in esame. Il risultato riportato in **Figura 6.21** è affiancato al *clustering* gerarchico (**Fig. 6.22**) applicato all'intera lista di geni filtrata per le basse intensità di segnale.



**Figura 6.21:** PCA dei trattamenti basata sui profili trascrizionali di 9446 geni differenzialmente espressi (*one-way ANOVA analysis*).



**Figura 6.22:** *Clustering* gerarchico (Distanza: Euclidean; Algoritmo di Linkage: Ward's) dei profili trascrizionali basato sull'intera lista di geni filtrata per basse intensità di segnale ( $\log_2$  intensità di segnale > 3, 22965 geni).

Entrambi gli approcci analitici mettono in evidenza che:

- nella risposta trascrizionale si osserva un effetto stagionale evidente;
- la risposta agli estratti estivi è molto simile tra i diversi

siti;

- rispetto al non trattato, il Fondo Urbano inverno si colloca ad una distanza intermedia tra la Max Ricaduta e il Controllo, che rimane il trattamento più distante e quindi differente dal non trattato.

### *Two-sample analysis*

Nella “*Two-sample analysis*” sono stati confrontati a due a due gli estratti Max Ricaduta vs Fondo Urbano, Controllo vs Fondo Urbano e Max Ricaduta vs Controllo, approfondendo poi nei dettagli il significato biologico delle modulazioni trascrizionali.

Tali valutazioni sono state effettuate solamente per i campioni relativi alla campagna invernale. Si è deciso di non analizzare i confronti a due relativi alla stagione estiva in quanto sia l’analisi PCA che il *clustering* hanno evidenziato una risposta trascrizionale molto simile tra i tre siti di Max Ricaduta, Controllo e Fondo Urbano.

I risultati dei t-test per l’identificazione dei geni differentemente espressi tra i campioni invernali sono riassunti in **Tabella 6.5** dove per ciascun confronto è riportato il numero di geni che superano il test con  $FDR < 0.01$  (*False Discovery Rate Benjamini-Hochberg*) e che presentano un *fold-change* superiore, in valore assoluto, ad 1.2.

<b>BALB/c 3T3</b> (t-test, FDR<0.01, fold-change >1.2)	
	<b>Winter</b>
Max ricaduta vs Fondo urbano	1584
Controllo vs Fondo urbano	1617
Max ricaduta vs Controllo	4190

**Tabella 6.5:** Numero di geni la cui espressione è modulata nei confronti a due sulla base del t-test (FDR<0.01) e con un valore assoluto di *fold-change* > 1.2.

Il numero di geni che risultano modulati nel confronto Max Ricaduta vs Controllo è il più alto. Questo dato conferma quanto osservato nell'analisi PCA riportata in **Figura 6.21**, che mostra come questi due campioni siano molto distanti tra di loro.

#### **6.2.4 Interpretazione biologica: campagna invernale**

Una volta identificati quali geni risultano significativamente modulati in seguito ai trattamenti con gli estratti invernali di PM<sub>2.5</sub> tramite t-test, è stato applicato Pathway Express come strumento per mettere in luce su quali processi biologici queste modulazioni vadano a convergere.

Viene calcolato un fattore di perturbazione di ciascun gene tenendo conto del valore normalizzato della modulazione di quel gene (*fold change*) e della perturbazione dei geni a valle del gene stesso. Infine viene calcolato il fattore di impatto (IF) di tutto il pathway basandosi sia sulla proporzione di geni regolati che sui fattori di perturbazione di ciascun gene del pathway. I fattori di impatto sono utilizzati per ordinare la lista dei pathway modulati (Draghici *et al.*, 2007).

Di queste analisi verranno riportati solo i risultati più schematici

ottenuti mediante Pathway Express (**Tab. 6.6**).

Campagna invernale		
Max ricaduta vs Fondo urbano	Controllo vs Fondo urbano	Max ricaduta vs Controllo
Circadian rhythm	Pathways in cancer	Cell adhesion molecules (CAMs)
Focal adhesion	Small cell lung cancer	Leukocyte transendothelial migration
MAPK signaling pathway	Prostate cancer	Circadian rhythm
Pathways in cancer	Apoptosis	Ribosome
Fc epsilon RI signaling pathway	Ubiquitin mediated proteolysis	Ubiquitin mediated proteolysis
T cell receptor signaling pathway	Cell cycle	Pathways in cancer
Type II diabetes mellitus	Chronic myeloid leukemia	Cell cycle
Glioma	Adherens junction	MAPK signaling pathway
p53 signaling pathway	p53 signaling pathway	Adherens junction
Natural killer cell mediated cytotoxicity	Pancreatic cancer	Focal adhesion
Toll-like receptor signaling pathway	ErbB signaling pathway	Small cell lung cancer
Phosphatidylinositol signaling system		Prostate cancer
Colorectal cancer		Regulation of actin cytoskeleton
		Apoptosis
		Glioma
		T cell receptor signaling pathway
		Phosphatidylinositol signaling system
		Toll-like receptor signaling pathway
		Nucleotide excision repair
		Chronic myeloid leukemia
		Pancreatic cancer
		Melanoma
		Renal cell carcinoma
		Wnt signaling pathway
		Base excision repair
		Colorectal cancer

**Tabella 6.6:** Analisi mediante Pathway Express: lista delle mappe geniche KEGG trascrizionalmente modulate ordinate secondo il valore del fattore d’impatto (IF>10, gamma-p value< 0.05).

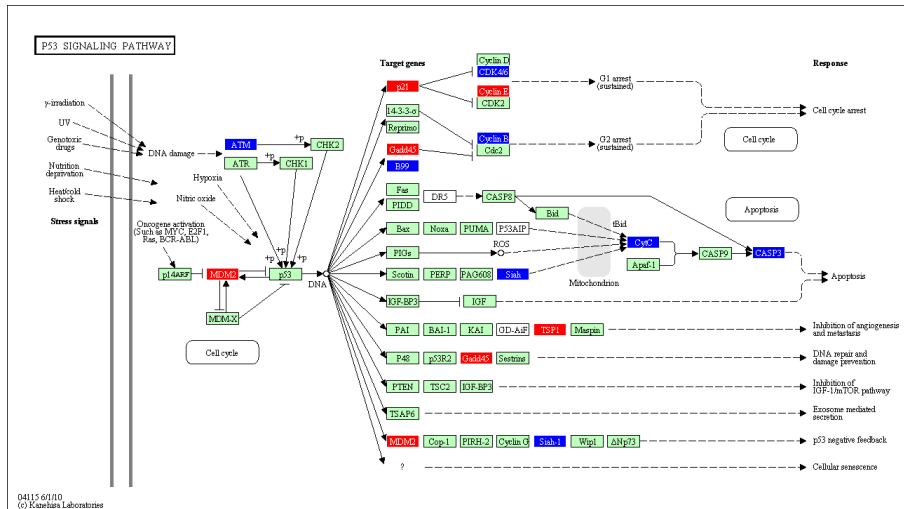
Alcune mappe geniche KEGG risultano particolarmente importanti per comprendere i temi biologici dominanti che caratterizzano i diversi confronti. Tra queste sicuramente vi è quella relativa al “*p53 signaling pathway*” che è la via di segnale controllata dalla proteina p53 in grado di regolare molti dei processi fisiologici di risposta a stress quali blocco del ciclo, riparo del DNA e morte cellulare per apoptosi.

Dall’analisi delle mappe relative a questo pathway deduciamo che sia nei siti Max Ricaduta (**Fig. 6.22**) che in Controllo (**Fig. 6.23**) rispetto al Fondo Urbano la via di segnale di p53 è attiva con il conseguente blocco del ciclo cellulare (induzione di p21 e GADD45).

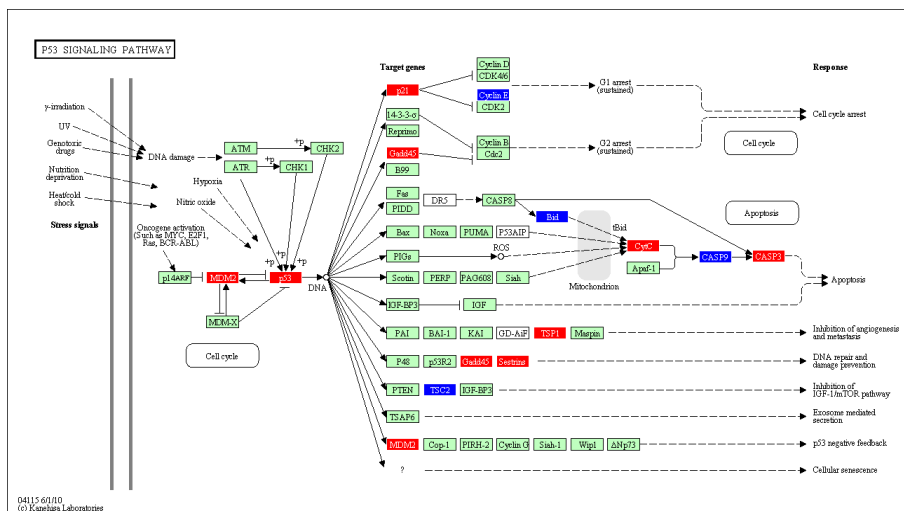
Gli esiti però sono differenti a seconda del trattamento: nel Controllo, infatti, si ha una chiara attivazione della trascrizione di alcuni effettori chiave della morte cellulare per apoptosi (CASP3) mentre nella Max Ricaduta prevale l’attivazione di un segnale di sopravvivenza confermato dall’attivazione di *MAPK signaling pathway*.

L’attivazione di questa via di segnale è confermata anche nel confronto Max Ricaduta vs Controllo dove, osservando le mappe geniche in dettaglio, ritroviamo i temi già visti: nel Controllo prevale l’attivazione trascrizionale delle vie di controllo del ciclo cellulare e dell’apoptosi (“*Pathways in cancer*”, “*Cell cycle*”, “*Apoptosis*”) mentre sono sostenute da geni prevalentemente up-regolati in Max Ricaduta rispetto Controllo le vie di riparo del danno al DNA e di trasduzione del segnale (“*MAPK signaling pathway*”, “*Phosphatidylinositol signaling system*”, “*Toll-like receptor signaling pathway*” e “*T cell receptor signaling pathway*”).





**Figura 6.22:** Mappa KEGG del segnale mediato da p53, restituita da Pathway Express, relativa al confronto Max ricaduta vs Fondo urbano invernale. (blu, geni sottoespressi; rosso: geni sovra-espressi, verde:geni della mappa genetica)



**Figura 6.23:** Mappa KEGG del segnale mediato da p53, restituita da Pathway Express, relativa al confronto Controllo vs Fondo urbano invernale. (blu, geni sottoespressi; rosso: geni sovra-espressi, verde:geni della mappa genetica)

## 6.3 Valutazione del rischio cancerogeno

### 6.3.1 Campagna estiva

#### *Caratterizzazioni chimiche: PM<sub>2,5</sub>, IPA e NIPA*

La numerosità dei campioni analizzati durante il periodo Giugno-Luglio 2008 non è la stessa nei diversi siti di campionamento. In alcuni casi la numerosità dei dati disponibili è inferiore al 50% del totale dei giorni di campionamento.

Nel sito Max Ricaduta Est le analisi di IPA su PM<sub>2,5</sub> sono state eseguite su 37 campioni sui 40 giorni di campionamento, quindi la media (ng/m<sup>3</sup>) su cui è stata operata la valutazione è rappresentativa della concentrazione media riscontrata al sito durante il periodo di campionamento.

Nel sito Controllo Est sono state effettuate 19 misurazioni, ognuna delle quali si riferisce a un periodo di 48 ore. Anche in questo sito quindi possiamo ragionevolmente considerare che la media (ng/m<sup>3</sup>) sia rappresentativa della concentrazione media riscontrata al sito durante il periodo di campionamento.

Diverso è il discorso per gli altri siti, per cui sono stati analizzati 8-10 campioni (ognuno dei quali riferito a un periodo di 48 ore). La scelta dei campioni da analizzare è stata fatta al fine di soddisfare i seguenti due punti:

1) massimizzare la differenza tra i siti di Max Ricaduta Est e Controllo Est rispetto alla modellizzazione dell'inceneritore;

2) ottenere la contemporaneità dei campioni analizzati nei diversi siti selezionando i 10 periodi di 48 ore che presentano i valori più elevati della differenza di ricaduta tra il massimo Est e

il suo controllo.

Le medie calcolate non sono quindi considerabili come concentrazioni medie riscontrate nei diversi siti durante il periodo di campionamento. Possono essere invece considerate come rappresentative del peggiore scenario dal punto di vista tossicologico in cui la sorgente “inceneritore” incide maggiormente nei siti di massima ricaduta e il meno possibile sugli altri siti.

Nella **Tabella 6.7** si evidenzia per il  $PM_{2,5}$  la misurazione gravimetrica espressa in  $\mu g/m^3$  nella seconda colonna e la relativa caratterizzazione chimica relativa agli IPA totali (terza colonna), alla concentrazione del singolo B(a)P, al totale degli IPA che presentano il fattore di equivalenza (PEF) (quarta colonna) e il relativo valore di trasformazione in B(a)P equivalenti (ultima colonna).

<b>IPA</b>					
	<b>PM<sub>2.5</sub></b>	IPA tot	B(a)P	IPA con PEF	<b>B(a)P eq</b>
	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	$\text{ng}/\text{m}^3$			
<b>Max ricaduta Est</b>	19.518 ± 7.212	0.500 ± 0.200	0.010 ± 0.008	0.224 ± 0.137	0.060 ± 0.026
<b>Controllo Est</b>	20.235 ± 7.422	0.406 ± 0.177	0.013 ± 0.007	0.194 ± 0.077	0.057 ± 0.011
<b>Max ricaduta Ovest*</b>	20.452 ± 6.079	0.489 ± 0.119	0.011 ± 0.006	0.195 ± 0.081	0.056 ± 0.010
<b>Controllo Ovest*</b>	19.142 ± 6.859	0.628 ± 0.363	0.018 ± 0.016	0.283 ± 0.179	0.086 ± 0.041 <sup>a</sup>
<b>Controllo distanza*</b>	18.647 ± 7.678	0.343 ± 0.075	0.012 ± 0.005	0.175 ± 0.071	0.056 ± 0.011
<b>Fondo urbano*</b>	17.949 ± 7.236	0.237 ± 0.075	0.009 ± 0.002	0.127 ± 0.038	0.050 ± 0.008
<b>Max fonti*</b>	19.825 ± 6.616	0.603 ± 0.194	0.016 ± 0.009 <sup>b</sup>	0.228 ± 0.127	0.060 ± 0.016
<b>Min ricaduta*</b>	20.199 ± 7.319	0.302 ± 0.111	0.004 ± 0.002 <sup>b</sup>	0.100 ± 0.033	0.042 ± 0.004 <sup>b</sup>

**Tabella 6.7:** Caratterizzazione chimica relativa a PM<sub>2.5</sub> e IPA.

I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, in riferimento ad un periodo di circa 40 giorni.

\* I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, considerando le misurazioni relative a campionamenti effettuati in circa 20 di 40 giorni di monitoraggio.

<sup>a</sup> p<0.05 rispetto a Max ricaduta Ovest, t-test.

<sup>b</sup> p<0.05 rispetto a Max ricaduta Est, t-test.

Per quanto riguarda il totale di IPA misurati e la somma degli IPA che presentano il fattore di potenza cancerogena non si osservano differenze statisticamente significative nei confronti effettuati.

Il valore del singolo B(a)P risulta essere maggiore con rilevanza statistica nei campioni relativi al sito Max Fonti rispetto al sito Max Ricaduta Est e risulta essere minore in Min Ricaduta rispetto a Max Ricaduta Est, come atteso.

Per quanto riguarda il valore trasformato in B(a)P equivalenti si hanno differenze significative nei campionamenti presso il sito Min Ricaduta, dove si riscontra un ammontare di B(a)P equivalenti inferiore rispetto a Max Ricaduta Est. Il valore di B(a)P equivalenti di Max Ricaduta Ovest è significativamente minore rispetto a quello del Controllo Ovest. In quest'ultima situazione si osserva un andamento opposto rispetto a quello atteso: il sito Controllo Ovest costituisce, infatti, il controllo negativo del punto di campionamento di Max Ricaduta Ovest.

Nella **Tabella 6.8** si evidenzia, per il  $PM_{2.5}$  la diversità della trasformazione in B(a)P equivalenti rispetto ai NIPA totali, al 2-nitrofluorene e al 1-nitropirene che rappresentano gli unici NIPA che presentano il fattore di equivalenza (PEF), misurati da ARPA-ER in questa stagione. Per quanto riguarda la numerosità dei campioni analizzati possono essere fatte considerazioni analoghe a quelle esposte per gli IPA.

<b>NIPA</b>					
	<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>NIPA tot</b>	<b>2-nitrofluorene</b>	<b>1-nitropyrene</b>	<b>2-nitrofluorene + 1-nitropyrene B(a)P eq</b>
	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	$\text{ng}/\text{m}^3$			
<b>Max ricaduta Est</b>	19.518 ± 7.212	0.628 ± 0.506	0.087 ± 0.234	0.326 ± 0.292	0.033 ± 0.029
<b>Controllo Est</b>	20.235 ± 7.422	0.045 ± 0.031	0.002	0.037 ± 0.031	0.004 ± 0.003
<b>Max ricaduta Ovest*</b>	20.452 ± 6.079	0.192 ± 0.091	0.002	0.184 ± 0.091	0.018 ± 0.009
<b>Controllo Ovest*</b>	19.142 ± 6.859	0.198 ± 0.140	0.007 ± 0.023	0.183 ± 0.130	0.018 ± 0.009
<b>Controllo distanza*</b>	18.647 ± 7.678	0.059 ± 0.156	0.002	0.051 ± 0.156	0.005 ± 0.016
<b>Fondo urbano*</b>	17.949 ± 7.236	0.010	0.002	0.002	0.0002
<b>Max fonti*</b>	19.825 ± 6.616	0.032 ± 0.027	0.002	0.015 ± 0.026	0.001 ± 0.003
<b>Min ricaduta*</b>	20.199 ± 7.319	0.010	0.002	0.002	0.0002

**Tabella 6.8:** Caratterizzazione chimica relativa a PM<sub>2.5</sub> e NIPA.

I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, in riferimento ad un periodo di circa 40 giorni.

\* I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, considerando le misurazioni relative a campionamenti effettuati in circa 20 di 40 giorni di monitoraggio.

I dati relativi alle analisi dei NIPA per il PM<sub>2.5</sub> non risultano essere significativamente differenti al t-test confrontando i diversi siti di campionamento.

Per il calcolo dei B(a)P equivalenti è stato considerato anche il contributo apportato dai NIPA (**Tab. 6.9**).

	IPA B(a)P eq	NIPA B(a)P eq	IPA+NIPA B(a)P eq
	ng/m <sup>3</sup>		
<b>Max ricaduta Est</b>	0.060 ± 0.026	0.033 ± 0.029	0.094 ± 0.041
<b>Controllo Est</b>	0.057 ± 0.011	0.004 ± 0.003	0.058 ± 0.018 <sup>a</sup>
<b>Max ricaduta Ovest*</b>	0.056 ± 0.010	0.018 ± 0.009	0.075 ± 0.015
<b>Controllo Ovest*</b>	0.086 ± 0.041	0.018 ± 0.013	0.105 ± 0.037 <sup>b</sup>
<b>Controllo distanza*</b>	0.056 ± 0.011	0.005 ± 0.016	0.061 ± 0.019
<b>Fondo urbano*</b>	0.050 ± 0.008	0.0002	0.051 ± 0.008 <sup>a</sup>
<b>Max fonti*</b>	0.060 ± 0.016	0.001 ± 0.003	0.061 ± 0.015 <sup>c</sup>
<b>Min ricaduta*</b>	0.042 ± 0.004	0.0002	0.042 ± 0.004 <sup>a</sup>

**Tabella 6.9:** B(a)P eq totali.

I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, in riferimento ad un periodo di circa 40 giorni.

\* I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, considerando le misurazioni relative a campionamenti effettuati in circa 20 di 40 giorni di monitoraggio.

<sup>a</sup> p<0.01 rispetto a Max ricaduta Est, t-test.

<sup>b</sup> p<0.05 rispetto a Max ricaduta Ovest, t-test.

<sup>c</sup> p<0.05 rispetto a Max ricaduta Est, t-test.

In seguito all'apporto del contributo dei NIPA nella valutazione dei B(a)P equivalenti, oltre alle significatività mostrate nella **Tabella 6.7**, hanno acquisito differenza significativa rispetto a Max Ricaduta Est anche i campioni relativi a Controllo Est (p<0.01), Fondo Urbano (p<0.01) e Max Fonti (p<0.05), dove la concentrazione di IPA trasformata in B(a)P equivalenti risulta essere minore del sito di massima

ricaduta Max Ricaduta Est.

*Rischio cancerogeno: IPA e NIPA*

Tutti questi valori sono stati confrontati con i limiti e i valori di UR presenti in letteratura per la via inalatoria e riportati in **Tabella 6.10**.

B(a)P come tale	<b>UR cancro:</b> $1,1 \times 10^{-3}/\mu\text{g}/\text{m}^3$ (California EPA, 2005)
B(a)P equivalenti	<b>UR cancro:</b> $8,7 \times 10^{-5}/\text{ng}/\text{m}^3$ (WHO, 2000) [arrotondabile a $1 \times 10^{-4}/\text{ng}/\text{m}^3$ ]
	$1 \times 10^{-4}/\text{ng}/\text{m}^3$ (CCTN, 1991)

**Tabella 6.10:** Valori limite tossicologici e UR cancerogeno per IPA, via inalatoria.

Nella **Tabella 6.11** sono mostrati i valori di rischio cancerogeno in relazione all'inalazione cronica (per tutta la vita) di B(a)P in relazione alla concentrazione rilevata nei vari siti.

<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>B(a)P come tale</b>	<b>Rischio di cancro</b>
	ng/m <sup>3</sup>	
<b>Max ricaduta Est</b>	$0.010 \pm 0.008$	$1.10 \times 10^{-8}$
<b>Controllo Est</b>	$0.013 \pm 0.007$	$1.43 \times 10^{-8}$
<b>Max ricaduta Ovest*</b>	$0.011 \pm 0.006$	$1.21 \times 10^{-8}$
<b>Controllo Ovest*</b>	$0.018 \pm 0.016$	$1.98 \times 10^{-8}$
<b>Controllo distanza*</b>	$0.012 \pm 0.005$	$1.32 \times 10^{-8}$
<b>Fondo urbano*</b>	$0.009 \pm 0.002$	$0.99 \times 10^{-8}$
<b>Max fonti*</b>	$0.016 \pm 0.009$	$1.76 \times 10^{-8}$
<b>Min ricaduta*</b>	$0.004 \pm 0.002$	$0.44 \times 10^{-8}$

**Tabella 6.11:** Rischio di cancro relativo al singolo B(a)P.



L'applicazione dell'unità di rischio cancerogeno per il B(a)P inalato porta a stimare un rischio cancerogeno dell'ordine di 1 su 100 milioni, senza differenza tra i siti.

Nella **Tabella 6.12** sono riportati i valori di rischio cancerogeno in relazione all'inalazione cronica di IPA espressi come B(a)P equivalenti.

<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>B(a)P eq</b>	<b>Rischio di cancro</b>
	ng/m <sup>3</sup>	
<b>Max ricaduta Est</b>	0.094 ± 0.041	0.94 x10 <sup>-5</sup>
<b>Controllo Est</b>	0.058 ± 0.018	0.58 x10 <sup>-5</sup>
<b>Max ricaduta Ovest*</b>	0.075 ± 0.015	0.75 x10 <sup>-5</sup>
<b>Controllo Ovest*</b>	0.105 ± 0.037	1.05 x10 <sup>-5</sup>
<b>Controllo distanza*</b>	0.061 ± 0.019	0.61 x10 <sup>-5</sup>
<b>Fondo urbano*</b>	0.051 ± 0.008	0.51 x10 <sup>-5</sup>
<b>Max fonti*</b>	0.061 ± 0.015	0.61 x10 <sup>-5</sup>
<b>Min ricaduta*</b>	0.042 ± 0.004	0.42 x10 <sup>-5</sup>

**Tabella 6.12:** Rischio di cancro relativo al valore trasformato in B(a)P eq.

L'applicazione dell'unità di rischio cancerogeno per il totale di B(a)P equivalenti porta a stimare un rischio cancerogeno dell'ordine di 1 su 100000, senza differenze significative tra i vari siti, in particolare tra Max Ricaduta Est e Controllo Est, utilizzando le UR per cancro definite in 1 su 10000 per 1 ng/m<sup>3</sup> di B(a)P equivalenti.

#### *Caratterizzazioni chimiche: PM<sub>2.5</sub>, PCB e diossine*

Nel caso di questi analiti le modalità di campionamento e le analisi successive hanno di fatto coperto tutto il periodo di campionamento, quindi possiamo considerare il valore calcolato

come rappresentativo della concentrazione media (per le diossine espressa in  $\text{fg}/\text{m}^3$ , mentre per i PCB in  $\text{pg}/\text{m}^3$ ) riscontrata nei siti esaminati durante il periodo di campionamento.

Nella **Tabella 6.13** si evidenzia, per il  $\text{PM}_{2.5}$ , la misurazione gravimetrica espressa in  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  nella seconda colonna e la relativa caratterizzazione chimica relativa ai PCB totali (terza colonna), ai PCB non diossino-simili (NDL-PCB) e ai PCB diossino-simili (DL-PCB) e il relativo valore di trasformazione in TCDD equivalenti (ultima colonna).

La **Tabella 6.14** mostra i valori di diossine (PCDD) e furani (PCDF) totali presenti nei campioni analizzati, la trasformazione di tale valore in termini di TCDD equivalenti e il contributo dato dai PCB diossino-simili al TCDD equivalente totale.

I dati relativi alle analisi dei PCB non risultano essere significativamente differenti al t-test confrontando i diversi siti di campionamento (**Tab. 6.13**). Neppure per le diossine si osservano differenze statisticamente significative al t-test confrontando i diversi siti di campionamento (**Tab. 6.14**).

<b>PCB</b>					
	<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>PCB tot</b>	<b>NDL-PCB</b>	<b>DL-PCB</b>	<b>DL_PCB TCDD eq</b>
	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	$\text{pg}/\text{m}^3$			
<b>Max ricaduta Est*</b>	19.518 ± 7.212	74.868 ± 25.345	68.820 ± 24.291	6.047 ± 2.417	0.0013 ± 0.0004
<b>Controllo Est</b>	20.235 ± 7.422	62.982 ± 23.235	57.440 ± 21.150	5.541 ± 2.243	0.0011 ± 0.0002
<b>Max fonti</b>	19.825 ± 6.616	73.660 ± 27.614	68.254 ± 25.762	5.405 ± 2.192	0.0011 ± 0.0002

<b>PCDD and PCDF</b>				
	<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>PCDD+PCDF tot</b>	<b>TCDD eq</b>	<b>PCDD+PCDF+DL-PCB TCDD eq</b>
	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	$\text{fg}/\text{m}^3$		
<b>Max ricaduta Est*</b>	19.518 ± 7.212	223.677 ± 114.998	16.099 ± 12.682	17.354 ± 12.962
<b>Controllo Est</b>	20.235 ± 7.422	231.641 ± 177.182	16.062 ± 4.826	17.206 ± 4.850
<b>Max fonti</b>	19.825 ± 6.616	179.098 ± 84.585	14.671 ± 5.403	15.767 ± 5.411

**Tabella 6.13 e 6.14:** Caratterizzazione chimica relativa a PM<sub>2.5</sub>, PCB e diossine.

I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, in riferimento al periodo dal 4 Giugno al 25 Luglio.

\* I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, considerando le misurazioni effettuate dal 4 Giugno al 25 Luglio, escludendo il periodo dal 12 al 19 Giugno.

*Rischio cancerogeno: PCB e diossine*

Tali valori sono stati confrontati con i limiti e i valori di UR presenti in letteratura per la via inalatoria e riportati in **Tabella 6.15**.

Diossine e PCB diossino-simili:
<b>UR cancro</b> (tumori in eccesso per inalazione per tutta la vita di 1 $\text{pg}/\text{m}^3$ di TCDD): $3,8 \times 10^{-5}$ (California EPA, 2005)

**Tabella 6.15:** Valori limite tossicologici e UR cancerogeno per diossine e PCB diossino-simili, via inalatoria.

Nella **Tabella 6.16** sono mostrati i valori di rischio cancerogeno in relazione all'inalazione cronica di PCB totali, molto simili nei tre siti e inferiori di quasi due ordini di grandezza a 1 su 1 milione.

<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>PCB tot</b>	<b>Rischio di cancro</b>
	$\text{pg}/\text{m}^3$	
<b>Max ricaduta Est</b>	$74.868 \pm 25.345$	$4.27 \times 10^{-8}$
<b>Controllo Est</b>	$62.982 \pm 23.235$	$3.59 \times 10^{-8}$
<b>Max fonti</b>	$73.660 \pm 27.614$	$4.20 \times 10^{-8}$

**Tabella 6.16:** Rischio di cancro relativo all'inalazione cronica di PCB totali.

Nella **Tabella 6.17** sono riportati i valori di rischio cancerogeno, di nuovo molto simili e inferiori a 1 su 1 milione, in relazione all'inalazione cronica di diossine, furani e PCB diossino-simili espressi come TCDD equivalenti.

<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>PCDD+PCDF+DL-PCB TCDD eq</b>	<b>Rischio di cancro</b>
	fg/m <sup>3</sup>	
<b>Max ricaduta Est</b>	17.354 ± 12.962	6.59 x10 <sup>-7</sup>
<b>Controllo Est</b>	17.206 ± 4.850	6.54 x10 <sup>-7</sup>
<b>Max fonti</b>	15.767 ± 5.411	5.99 x10 <sup>-7</sup>

**Tabella 6.17:** Rischio di cancro relativo all'inalazione cronica di diossine, furani e PCB diossino-simili espressi come TCDD equivalenti.

### 6.3.2 Campagna invernale

#### *Caratterizzazioni chimiche: PM<sub>2.5</sub>, IPA e NIPA*

Come per la campagna estiva, la numerosità dei campioni analizzati nella campagna invernale non è la stessa nei diversi siti. In alcuni casi la numerosità dei dati disponibili è inferiore al 50% del totale dei giorni di campionamento.

Nel sito Max Ricaduta Est le analisi di IPA su PM<sub>2.5</sub> sono state eseguite su 40 campioni sui 40 giorni di campionamento, quindi la media (ng/m<sup>3</sup>) su cui è stata operata la valutazione è rappresentativa della concentrazione media riscontrata al sito durante il periodo di campionamento.

Nei siti Controllo Est, Max Ricaduta Ovest e Controllo Ovest sono state effettuate 20 misurazioni, ognuna delle quali si riferisce a un periodo di 48 ore. Anche in questi sito quindi possiamo ragionevolmente considerare che la media (ng/ m<sup>3</sup>) sia rappresentativa della concentrazione media del periodo di campionamento.

Diverso è il discorso per gli altri siti, per cui sono stati analizzati 9-10 campioni (ognuno dei quali riferito a un periodo di 48 ore). La scelta dei campioni da analizzare è stata fatta, da ARPA-ER, sulla base degli stessi criteri utilizzati per la campagna estiva.

Nella **Tabella 6.18** si evidenzia per il PM<sub>2.5</sub> la misurazione gravimetrica espressa in µg/m<sup>3</sup> nella seconda colonna e la relativa caratterizzazione chimica relativa agli IPA totali (terza colonna), alla concentrazione del singolo B(a)P, al totale degli IPA che presentano il fattore di equivalenza (PEF) (quarta colonna) e il relativo valore di trasformazione in B(a)P equivalenti (ultima colonna).

<b>IPA</b>					
	<b>PM<sub>2,5</sub></b>	<b>IPA</b>	<b>B(a)P</b>	<b>IPA con PEF</b>	<b>B(a)P eq</b>
	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	$\text{ng}/\text{m}^3$			
<b>Max ricaduta Est</b>	34.54 ± 21.23	5.747 ± 3.172	0.363 ± 0.235	4.457 ± 2.543	1.038 ± 0.666
<b>Controllo Est</b>	35.05 ± 20.20	10.791 ± 4.778	0.929 ± 0.448 <sup>a</sup>	8.574 ± 3.861	2.146 ± 1.212 <sup>a</sup>
<b>Max ricaduta Ovest</b>	35.04 ± 20.51	3.914 ± 2.238	0.176 ± 0.144	2.975 ± 1.720	0.641 ± 0.924
<b>Controllo Ovest</b>	32.78 ± 19.99	6.257 ± 3.192	0.338 ± 0.226 <sup>b</sup>	4.576 ± 2.487	0.875 ± 0.731
<b>Controllo distanza*</b>	34.75 ± 20.40	6.704 ± 2.777	0.301 ± 0.186	5.487 ± 2.453	0.847 ± 0.443
<b>Fondo urbano*</b>	29.40 ± 19.24	4.593 ± 2.661	0.269 ± 0.184	3.423 ± 1.959	0.644 ± 0.360
<b>Max fonti*</b>	34.64 ± 21.02	6.510 ± 3.036	0.190 ± 0.151 <sup>c</sup>	5.338 ± 2.518	1.344 ± 0.743
<b>Min ricaduta*</b>	33.05 ± 20.04	5.688 ± 1.905	0.402 ± 0.152	4.380 ± 1.499	1.163 ± 0.382

**Tabella 6.18:** Caratterizzazione chimica relativa a PM<sub>2,5</sub> e IPA.

I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, in riferimento ad un periodo di circa 40 giorni.

\* I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, considerando le misurazioni relative a campionamenti effettuati in circa 20 di 40 giorni di monitoraggio.

<sup>a</sup> p<0.01 rispetto a Max ricaduta Est, t-test.

<sup>b</sup> p<0.01 rispetto a Max ricaduta Ovest, t-test.

<sup>c</sup> p<0.05 rispetto a Max ricaduta Est, t-test.

Come per la campagna estiva, le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il t-test e confrontando le misurazioni effettuate nei siti di massima ricaduta (Est ed Ovest) con quelle dei relativi siti di minima ricaduta (rispettivamente Controllo Est ed Ovest) e quelle dei siti di Fondo Urbano, di Min Ricaduta e di massima influenza di tutte le fonti (Max Fonti).

Per quanto riguarda il totale di IPA misurati e la somma degli IPA che presentano il fattore di potenza cancerogena non si osservano differenze statisticamente significative nei confronti effettuati.

Il valore di B(a)P nei campioni relativi ai siti di controllo Est ed Ovest risulta essere maggiore con significatività statistica ( $p < 0.01$ ) rispetto ai corrispondenti siti di massima ricaduta Est ed Ovest.

L'andamento si capovolge per quanto riguarda il sito Max Fonti, dove la concentrazione di B(a)P è inferiore ( $p < 0.05$ ) rispetto a Max Ricaduta Est.

Per quanto riguarda il valore trasformato in B(a)P equivalenti si hanno differenze significative nei campionamenti presso Max Ricaduta Est rispetto a Controllo Est, dove tale valore risulta più elevato.

Nella **Tabella 6.19** si evidenzia, per il  $PM_{2.5}$ , la diversità della trasformazione in B(a)P equivalente rispetto ai NIPA totali, al 6-nitrocrisene e al 1-nitropirene che rappresentano gli unici tra i NIPA misurati da ARPA-ER che presentano il fattore di equivalenza (PEF).

Per quanto riguarda la numerosità dei campioni analizzati possono essere fatte considerazioni analoghe a quelle esposte per gli IPA.



<b>NIPA</b>					
	<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>NIPA tot</b>	<b>6-nitrochrysene</b>	<b>1-nitropyrene</b>	<b>6-nitrochrysene + 1-nitropyrene B(a)P eq</b>
	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	$\text{ng}/\text{m}^3$			
<b>Max ricaduta Est</b>	34.54 ± 21.23	0.038 ± 0.030	0.002	0.008 ± 0.013	0.021 ± 0.001
<b>Controllo Est</b>	35.05 ± 20.20	0.045 ± 0.040	0.002	0.002	0.020
<b>Max ricaduta Ovest</b>	35.04 ± 20.51	0.103 ± 0.080	0.002	0.008 ± 0.008	0.021 ± 0.001
<b>Controllo Ovest</b>	32.78 ± 19.99	0.204 ± 0.173	0.005 ± 0.010	0.027 ± 0.038	0.051 ± 0.097
<b>Controllo distanza*</b>	34.75 ± 20.40	0.056 ± 0.033	0.002	0.015 ± 0.015	0.022 ± 0.001
<b>Fondo urbano*</b>	29.40 ± 19.24	0.057 ± 0.037	0.002	0.026 ± 0.027	0.023 ± 0.003
<b>Max fonti*</b>	34.64 ± 21.02	0.025 ± 0.013	0.002	0.003 ± 0.001	0.020
<b>Min ricaduta*</b>	33.05 ± 20.04	0.067 ± 0.043	0.002	0.034 ± 0.030	0.023 ± 0.003

**Tabella 6.19:** Caratterizzazione chimica relativa a PM<sub>2.5</sub> e NIPA.

I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, in riferimento ad un periodo di circa 40 giorni.

\* I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, considerando le misurazioni relative a campionamenti effettuati in circa 20 di 40 giorni di monitoraggio.

In seguito all'apporto del contributo dei NIPA nella valutazione dei B(a)P equivalenti l'unica differenza statisticamente significativa rimane quella fra Max Ricaduta Est e il suo controllo (Controllo Est), dove il valore risulta più elevato (**Tab. 6.20**).

	IPA B(a)P eq	NIPA B(a)P eq	IPA+NIPA B(a)P eq
	ng/m <sup>3</sup>		
<b>Max ricaduta Est</b>	1.038 ± 0.666	0.021 ± 0.001	1.058 ± 0.666
<b>Controllo Est</b>	2.146 ± 1.212	0.002	2.166 ± 1.180 <sup>a</sup>
<b>Max ricaduta Ovest*</b>	0.641 ± 0.924	0.021 ± 0.001	0.662 ± 0.903
<b>Controllo Ovest*</b>	0.875 ± 0.731	0.051 ± 0.097	0.926 ± 0.718
<b>Controllo distanza*</b>	0.847 ± 0.443	0.022 ± 0.001	0.869 ± 0.437
<b>Fondo urbano*</b>	0.644 ± 0.360	0.023 ± 0.003	0.667 ± 0.528
<b>Max fonti*</b>	1.344 ± 0.743	0.020	1.365 ± 0.832
<b>Min ricaduta*</b>	1.163 ± 0.382	0.0234 ± 0.003	1.186 ± 0.384

**Tabella 6.20:** B(a)P eq totali.

I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, in riferimento ad un periodo di circa 40 giorni.

\* I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, considerando le misurazioni relative a campionamenti effettuati in circa 20 di 40 giorni di monitoraggio.

<sup>a</sup> p<0.01 rispetto a Max ricaduta Est, t-test.

### *Rischio cancerogeno: IPA e NIPA*

I valori delle caratterizzazioni chimiche sono stati confrontati con i limiti e i valori di UR presenti in letteratura per la via inalatoria e riportati in **Tabella 6.10**.

Nella **Tabella 6.21** sono mostrati i valori di rischio cancerogeno in relazione all'inalazione cronica di B(a)P come tale.

<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>B(a)P come tale</b>	<b>Rischio di cancro</b>
	ng/m <sup>3</sup>	
<b>Max ricaduta Est</b>	0.363 ± 0.235	3.99 x10 <sup>-7</sup>
<b>Controllo Est</b>	0.929 ± 0.448	10.22 x10 <sup>-7</sup>
<b>Max ricaduta Ovest</b>	0.176 ± 0.144	1.94 x10 <sup>-7</sup>
<b>Controllo Ovest</b>	0.338 ± 0.226	3.72 x10 <sup>-7</sup>
<b>Controllo distanza</b>	0.301 ± 0.186	3.31 x10 <sup>-7</sup>
<b>Fondo urbano</b>	0.269 ± 0.184	2.96 x10 <sup>-7</sup>
<b>Max fonti</b>	0.190 ± 0.151	2.09 x10 <sup>-7</sup>
<b>Min ricaduta</b>	0.402 ± 0.152	4.42 x10 <sup>-7</sup>

**Tabella 6.21:** Rischio di cancro relativo al singolo B(a)P.

Nella **Tabella 6.22** sono riportati i valori di rischio cancerogeno in relazione all'inalazione cronica di IPA espressi come B(a)P equivalenti.

<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>B(a)P eq</b>	<b>Rischio di cancro</b>
	ng/m <sup>3</sup>	
<b>Max ricaduta Est</b>	1.058 ± 0.666	1.06 x10 <sup>-4</sup>
<b>Controllo Est</b>	2.166 ± 1.180	2.17 x10 <sup>-4</sup>
<b>Max ricaduta Ovest</b>	0.662 ± 0.903	0.66 x10 <sup>-4</sup>
<b>Controllo Ovest</b>	0.926 ± 0.718	0.93 x10 <sup>-4</sup>
<b>Controllo distanza</b>	0.869 ± 0.437	0.87 x10 <sup>-4</sup>
<b>Fondo urbano</b>	0.667 ± 0.528	0.67 x10 <sup>-4</sup>
<b>Max fonti</b>	1.365 ± 0.832	1.36 x10 <sup>-4</sup>
<b>Min ricaduta</b>	1.186 ± 0.384	1.19 x10 <sup>-4</sup>

**Tabella 6.22:** Rischio di cancro relativo al valore trasformato in B(a)P eq.

L'applicazione dell'unità di rischio cancerogeno per il totale di B(a)P equivalenti porta a stimare un rischio

cancerogeno dell'ordine di 1 su 10000, utilizzando le UR per cancro definite in 1 su 10000 per 1 ng/m<sup>3</sup> di B(a)P equivalenti.

*Caratterizzazioni chimiche: PM<sub>2.5</sub>, PCB e diossine*

Anche per la campagna invernale le modalità di campionamento hanno di fatto coperto tutto il periodo d'interesse, quindi possiamo considerare il valore calcolato come rappresentativo della concentrazione media (per le diossine espressa in fg/m<sup>3</sup>, mentre per i PCB in pg/m<sup>3</sup>) riscontrata nei siti esaminati durante il periodo di campionamento.

Nella **Tabella 6.23** si evidenzia per il PM<sub>2.5</sub> la misurazione gravimetrica espressa in µg/m<sup>3</sup> nella seconda colonna e la relativa caratterizzazione chimica relativa ai PCB totali (terza colonna), ai PCB non diossino-simili (NDL-PCB) e ai PCB diossino-simili (DL-PCB) e il relativo valore di trasformazione in TCDD equivalenti (ultima colonna).

<b>PCB</b>					
	<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>PCB tot</b>	<b>NDL-PCB</b>	<b>DL-PCB</b>	<b>DL-PCB TCDD eq</b>
	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	$\text{pg}/\text{m}^3$			
<b>Max ricaduta Est**</b>	34.54 ± 21.23	106.107 ± 77.443	95.041 ± 71.617	11.065 ± 8.920	0.0012 ± 0.0003
<b>Controllo Est*</b>	35.05 ± 20.20	128.701 ± 106.361	115.384 ± 92.978	13.317 ± 13.746	0.0013 ± 0.0004
<b>Max fonti</b>	34.64 ± 21.02	117.220 ± 103.212	106.787 ± 91.256	10.433 ± 12.665	0.0012 ± 0.0004

<b>PCDD and PCDF</b>				
	<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>PCDD+PCDF tot</b>	<b>TCDD eq</b>	<b>PCDD+PCDF+DL-PCB TCDD eq</b>
	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	$\text{fg}/\text{m}^3$		
<b>Max ricaduta Est**</b>	34.54 ± 21.23	612.387 ± 348.427	16.580 ± 6.496	17.803 ± 6.636
<b>Controllo Est*</b>	35.05 ± 20.20	506.304 ± 270.583	22.713 ± 12.601	24.292 ± 13.130
<b>Max fonti</b>	34.64 ± 21.02	599.410 ± 264.980	22.526 ± 13.682	23.723 ± 13.570

**Tabella 6.23 e 6.24:** Caratterizzazione chimica relativa a PM<sub>2.5</sub>, PCB e diossine.

I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, in riferimento al periodo dal 16 Gennaio al 3 Marzo.

\*\* I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, considerando le misurazioni effettuate dal 16 Gennaio al 3 Marzo, escludendo il periodo dal 13 al 16 Febbraio.

\* I dati sono espressi come concentrazione media ± SD, considerando le misurazioni effettuate dal 16 Gennaio al 3 Marzo, escludendo il periodo dal 26 al 30 Gennaio.

La **Tabella 6.24** mostra i valori di diossine e furani totali presenti nei campioni analizzati, la trasformazione di tale valore in termini di TCDD equivalenti e il contributo dato dai PCB diossino-simili.

Nelle misurazioni relative ai PCB effettuate nella campagna invernale, come per quella estiva, non si osservano differenze statisticamente significative al t-test confrontando i diversi siti di campionamento (**Tab. 6.23**).

Anche i dati relativi alle analisi di diossine e furani non risultano essere significativamente differenti al t-test confrontando i diversi siti di campionamento (**Tab. 6.24**).

*Rischio cancerogeno: PCB e diossine*

I valori delle caratterizzazioni chimiche sono stati confrontati con i limiti e i valori di UR presenti in letteratura in relazione alla via inalatoria e riportati in **Tabella 6.15**.

Nella **Tabella 6.25** sono mostrati i valori di rischio cancerogeno in relazione all'inalazione cronica di PCB totali, che risultano simili nei tre siti analizzati e inferiori di oltre un ordine di grandezza a 1 su 1 milione.

<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>PCB tot</b>	<b>Rischio di cancro</b>
	pg/m <sup>3</sup>	
<b>Max ricaduta Est</b>	106.107 ± 77.443	6.05 x10 <sup>-8</sup>
<b>Controllo Est</b>	128.701 ± 106.361	7.34 x10 <sup>-8</sup>
<b>Max fonti</b>	117.220 ± 103.212	6.68 x10 <sup>-8</sup>

**Tabella 6.25:** Rischio di cancro relativo all'inalazione cronica di PCB totali.

Nella **Tabella 6.26** sono riportati i valori di rischio

cancerogeno in relazione all'inalazione cronica di diossine, furani e PCB diossino-simili espressi come TCDD equivalenti, che risultano simili nei tre siti analizzati e inferiori di oltre un ordine di grandezza a 1 su 1 milione.

<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>PCDD+PCDF+DL-PCB TCDD eq</b>	<b>Rischio di cancro</b>
	fg/m <sup>3</sup>	
<b>Max ricaduta Est</b>	17.803 ± 6.636	6.77 x10 <sup>-7</sup>
<b>Controllo Est</b>	24.292 ± 13.130	9.23 x10 <sup>-7</sup>
<b>Max fonti</b>	23.723 ± 13.570	9.01 x10 <sup>-7</sup>

**Tabella 6.26:** Rischio di cancro relativo all'inalazione cronica di diossine, furani e PCB diossino-simili espressi come TCDD equivalenti.

## CAPITOLO 7

### Discussione e conclusioni

#### *Cancerogenesi in vitro*

Tutti gli estratti di PM<sub>2.5</sub> prelevati nel corso delle campagne estiva e invernale nei diversi siti di campionamento sono risultati negativi quando esaminati nel test di trasformazione *in vitro*. Gli incrementi, pur significativi, nella frequenza di trasformazione calcolati per le dosi più alte di trattamento per gli estratti invernali dei siti Controllo Est e Fondo Rurale possono essere considerati come false positività, determinate dal massiccio effetto citotossico associato (> 90%).

Nel test di citotossicità gli estratti organici di particolato urbano raccolto sia nella stagione invernale che in quella estiva, infatti, hanno indotto significativi effetti citotossici sulle cellule BALB/c 3T3 A31-1-1.

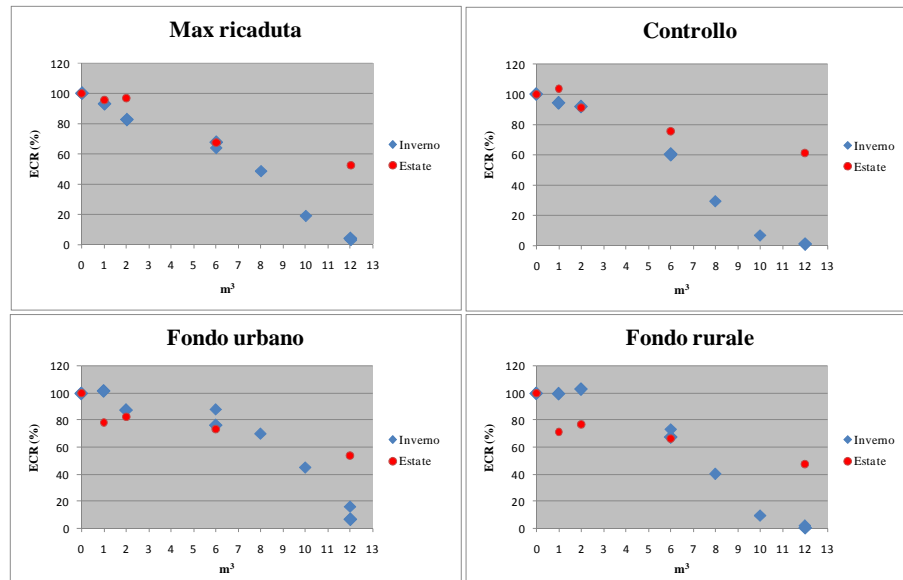
Gli effetti citotossici indotti dai campioni variano in dipendenza dal periodo di campionamento (effetto stagionale, **Fig. 7.1**) e del sito di campionamento (**Fig. 6.10** e **6.19**).

Gli estratti invernali in generale sono stati più efficaci degli estratti di PM estivo nell'indurre citotossicità, soprattutto per le dosi elevate (**Fig. 7.1**).

Anche in studi precedentemente condotti con estratti organici di particolato urbano raccolto nella stagione invernale erano stati rilevati effetti citotossici significativi, che sono stati messi in relazione ai livelli elevati di PM<sub>2.5</sub> (µg/m<sup>3</sup>) riscontrati e



alla elevata concentrazione di IPA adsorbiti al particolato invernale (Colacci *et al.*, 2007).



**Figura 7.1:** Confronto tra effetti citotossici degli estratti di PM<sub>2.5</sub> delle campagne estiva e invernale. ECR = efficienza clonale relativa.

L'effetto della variabile sito non è lo stesso in estate o in inverno, come è dimostrato graficamente in **Figura 6.10** e **6.19**. Per entrambe le campagne di monitoraggio (estiva 2008 e invernale 2009) la tossicità associata ai campioni prelevati nel sito di Max Ricaduta Est non risulta essere superiore rispetto a quella associata ai campioni prelevati presso il sito di Controllo Est. Le differenze di comportamento evidenziate tra i siti in termini di citotossicità nell'ambito delle singole campagne non possono semplicemente essere messe in relazione con la quantità di particolato ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a parità di  $\text{m}^3$  di aria campionata.

La trasformazione morfologica, la citotossicità e la genotossicità del particolato o di estratti organici di particolato sono state correlate in numerosi studi con la concentrazione di IPA o di IPA sostituiti misurata nell'estratto o nell'aria

campionata (Zhao *et al.*, 2003; McDonald *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2010).

Alcuni IPA e NIPA sono in grado di indurre effetti trasformanti nel modello *in vitro* BALB/c 3T3 o nella linea Bhas42, derivata dalle 3T3 per trasfezione con un oncogene attivato e anch'essa utilizzata per la valutazione del potenziale trasformante di composti chimici (Asada *et al.*, 2005; OECD, 2007; Sakai *et al.*, 2010). La maggior parte degli IPA esercita anche effetti citotossici in questi modelli cellulari. Non sono noti studi dove siano stati valutati nella linea BALB/c 3T3 gli effetti su questi *endpoint* del trattamento con miscele binarie o complesse di IPA in varie proporzioni. Studi *in vitro* su altri modelli cellulari hanno dimostrato sia effetti inibitori che sinergici sulla formazione di addotti al DNA indotti dal trattamento con miscele binarie di IPA di diversa potenza (Sevastyanova *et al.*, 2007). Recentemente la IARC ha pubblicato i risultati di uno studio in cui la cancerogenicità di IPA è stata sottoposta a nuova valutazione alla luce dei dati epidemiologici, nell'animale e meccanicistici più recenti (IARC, 2010). Gli studi effettuati negli animali e relativi a miscele binarie di IPA con diversa potenza cancerogena hanno condotto all'ipotesi di additività degli effetti, con un diverso comportamento a seconda della dose. A basse dosi di miscela si osservano risposte più che additive, mentre sono additive le risposte alle alte dosi, probabilmente per un effetto di saturazione metabolica.

Per quanto riguarda questo studio non sono purtroppo disponibili determinazioni analitiche eseguite sugli estratti in acetone di PM<sub>2.5</sub> utilizzati per le analisi tossicologiche in quanto le caratterizzazioni effettuate da ARPA-ER, impiegate anche per

la valutazione del rischio cancerogeno, sono relative a filtri estratti *ad hoc* per ogni singolo composto e non sono rappresentative delle concentrazioni medie riscontrate nei diversi siti durante il periodo di campionamento ma sono da considerarsi rappresentative del peggiore scenario dal punto di vista tossicologico.

In conclusione, i dati ottenuti nel test di trasformazione *in vitro* non supportano l'esistenza di un eccesso di rischio cancerogeno attribuibile al PM<sub>2.5</sub> prelevato nel punto di massima ricaduta dell'impianto di incenerimento durante le due campagne effettuate.

### ***Analisi trascrizionale***

L'analisi trascrizionale, effettuata sul pool di RNA estratto dalle cellule BALB/c 3T3 in seguito all'esposizione ai campioni di PM<sub>2.5</sub> dei tre siti valutati (Max Ricaduta Est, Controllo Est e Fondo Urbano) ha evidenziato in sintesi:

- un effetto stagionale evidente;
- una risposta analoga tra i siti nella campagna estiva
- ed un maggior effetto tossico per l'estratto invernale di Controllo Est, rispetto sia al controllo solvente che ai siti di Max Ricaduta Est e di Fondo Urbano, con un'attivazione anche di alcuni marcatori di morte cellulare per apoptosi.

La scelta di condurre l'analisi trascrizionale utilizzando il pool, innanzitutto, è stata dettata dalla necessità di considerare la variabilità intrinseca a qualsiasi sistema biologico contenendo costi e tempi sperimentali. Pur essendo un approccio molto utilizzato negli esperimenti di microarray, il "pooling" dell'RNA

deve essere applicato con cautela soprattutto se si vuole valutare la risposta biologica di individui geneticamente differenti. Svariate pubblicazioni dimostrano infatti che il “pooling”, in questo caso, comporta il rischio di commettere errori nella stime statistiche (Kendziorski *et al.*, 2003; Churchill *et al.*, 2002). Riteniamo però che in sistemi *in vitro*, costituiti da linee cellulari stabilizzate, mantenute in condizioni di coltura standard tali da rendere improbabile la selezione di sottocloni, il “pooling” dei campioni non comporti una perdita di informazioni biologiche critiche. Uno dei lavori capostipite (Ross *et al.*, 2000) sull’utilizzo di tecniche microarray e di analisi trascrizionale di linee cellulari riguarda le 60 linee cellulari umane di origine tumorale del “*National Cancer Institute’s Developmental Therapeutics Program (DTP)*” (<http://dtp.nci.nih.gov>). Questo lavoro analizza tre repliche indipendenti (dallo scongelamento all’ibridazione) di due linee, una mammaria, MCF-7, ed una mieloide, K562, ottenendo, dopo filtrazione dei segnali a bassa intensità, un coefficiente di correlazione variabile da 0.83 a 0.92 a dimostrazione di una alta riproducibilità del dato. Ovviamente con il tipo di disegno sperimentale proposto per questo studio la varianza stimata utilizzata per i test statistici è di natura tecnica e in quanto tale può portare ad una sottostima della varianza biologica. Rimane il fatto che, lavorando su un modello *in vitro*, qualsiasi dato può essere sperimentalmente ripetuto e confermato in qualsiasi momento.

Nella visualizzazione dei profili di tutti gli estratti tramite PCA, oltre al fatto che gli estratti estivi hanno mostrato un comportamento molto simile tale da non consentire un’analisi dei confronti a due (“*Two samples analysis*”), si è osservata una

distanza sostanziale tra Max Ricaduta Est e Controllo Est invernali, fermo restando che risulta Controllo Est l'estratto più lontano dal controllo solvente quindi con maggiori differenze di espressione genica.

A livello biologico, il profilo trascrizionale ottenuto confrontando Controllo Est vs Fondo Urbano ha interessato un blocco del ciclo cellulare mediato da p53 affiancato all'induzione di segnali apoptotici, mentre nel confronto Max Ricaduta Est vs Fondo Urbano si è osservato un arresto del ciclo associato sia alla presenza di segnali di sopravvivenza che all'attivazione di meccanismi di riparo. Queste osservazioni potrebbero significare una maggiore tossicità a carico di Controllo Est nella comparazione con Fondo Urbano, proprio perché la cellula attiva meccanismi di morte cellulare dati dall'incapacità di reagire ad un insulto troppo forte. Questo non succede nel caso di Max Ricaduta Est vs Fondo Urbano in cui si ha soltanto un blocco del ciclo cellulare tale da consentire alla cellula l'attivazione di meccanismi di riparo, che unitamente ai segnali di sopravvivenza rilevati, fanno pensare ad una capacità da parte della cellula di gestire e risolvere il danno ricevuto. Anche dal confronto diretto Max Ricaduta Est vs Controllo Est è possibile individuare la differente risposta evocata da Max Ricaduta Est.

Il confronto Max Ricaduta Est vs Fondo Urbano ha evidenziato anche l'attivazione di processi infiammatori dove l'up-regolazione di marcatori come p38 e JNK possono mediare l'innescamento di una risposta infiammatoria. Questo dato non rappresenta una novità in quanto altri lavori hanno documentato l'attivazione trascrizionale di questi processi in risposta a fumo di sigaretta (Bosio *et al.*, 2002). La letteratura scientifica

attribuisce inoltre alla deregolazione di questi processi un ruolo rilevante nell'eziologia di patologie correlate all'esposizione a polveri sottili, come quelle a carico del sistema cardiovascolare (Delfino *et al.*, 2005).

In conclusione gli estratti Max Ricaduta Est e Controllo Est hanno un comportamento piuttosto simile, che li differenzia da Fondo Urbano, con effetti più marcati a carico di Controllo Est, suggerendo che non vi siano effetti direttamente e solamente ascrivibili all'attività dell'inceneritore.

### ***Risk Assessment***

Le valutazioni sui dati raccolti nelle due campagne di monitoraggio sono così riassumibili:

La concentrazione degli inquinanti aerodispersi valutati nel PM<sub>2.5</sub>, quali:

- IPA e NIPA (espressi come totale dei singoli IPA misurati e somma di quelli che presentano il fattore di potenza cancerogena, oltre al valore del singolo B(a)P e del valore trasformato in B(a)P equivalenti),
- PCB (sia totali, sia diossino-simili, sia non diossino-simili),
- diossine e furani (sia totali che trasformati in TCDD equivalenti)

non risulta essere superiore nei campioni prelevati nei siti di massima ricaduta (Max Ricaduta Est ed Ovest) rispetto ai campionamenti effettuati presso i rispettivi controlli (Controllo Est ed Ovest), in entrambe le campagne di monitoraggio (estiva 2008 e invernale 2009).

Fa eccezione il valore trasformato in B(a)P equivalenti relativo alla campagna estiva. In seguito all'apporto del contributo dei NIPA nella valutazione dei B(a)P equivalenti, infatti, ha acquisito differenza significativa rispetto a Max Ricaduta Est il campione relativo al suo controllo (Controllo Est,  $p < 0.01$ ) dove la concentrazione di IPA trasformata in B(a)P equivalenti risulta essere minore del sito di massima ricaduta delle polveri (Max Ricaduta Est).

Occorre sottolineare che tale significatività è sì correlata all'aggiunta della quota di B(a)P equivalenti relativa ai NIPA, ma questa non può essere considerata rappresentativa del reale contributo dei NIPA dal momento che le caratterizzazioni chimiche sono state effettuate solo su 2 NIPA che hanno PEF (2-nitrofluorene e 1-nitropirene) sui 7 presenti in letteratura e che il loro contributo in termini di PEF è fra i più bassi (rispettivamente 0.01 e 0.1). Pertanto il dato di Max Ricaduta Est e Controllo Est, citato nella **Tabella 6.9**, è da tenere parzialmente artificioso e dovuto a *bias* di campionamento.

Alla luce di tali osservazioni sperimentali e sulla base dei modelli di ricaduta valutati, l'impatto sulla qualità dell'aria dell'impianto di termovalorizzazione di Bologna sembra non sussistere.

Confrontando le misurazioni di IPA effettuate nelle due campagne di monitoraggio (**Tab. 7.1**) si osserva un aumento nella concentrazione di tali contaminanti di circa un ordine di grandezza durante la stagione invernale 2009.

<b>IPA</b>		
<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>Estate</b>	<b>Inverno</b>
	<b>IPA tot (ng/m<sup>3</sup>)</b>	
<b>Max ricaduta Est</b>	0.500 ± 0.200	5.747 ± 3.172
<b>Controllo Est</b>	0.406 ± 0.177	10.791 ± 4.778
<b>Max ricaduta Ovest</b>	0.489 ± 0.119	3.914 ± 2.238
<b>Controllo Ovest</b>	0.628 ± 0.363	6.257 ± 3.192
<b>Controllo distanza</b>	0.343 ± 0.075	6.704 ± 2.777
<b>Fondo urbano</b>	0.237 ± 0.075	4.593 ± 2.661
<b>Max fonti</b>	0.603 ± 0.194	6.510 ± 3.036
<b>Min ricaduta</b>	0.302 ± 0.111	5.688 ± 1.905

**Tabella 7.1:** Confronti estate vs inverno relativi alla concentrazione di IPA totali. I dati sono espressi come concentrazione media ± SD.

I confronti relativi alle concentrazioni totali di IPA risultano essere **tutti statisticamente significativi (p<0.01)** al t-test.

Nelle due campagne di monitoraggio (estiva ed invernale) non sono stati analizzati gli stessi NIPA, e, in particolare, è stato valutato, in entrambi i periodi, solo un NIPA correlabile, tramite PEF, al potenziale cancerogeno del B(a)P e cioè l'1-nitropirene.

Per i confronti delle concentrazioni nelle due campagne di monitoraggio, quindi, si è fatto riferimento (**Tab. 7.2**) solamente a 1-nitronaftalene, 9-nitroantracene, 9-nitrofenantrene e 1-nitropirene. I due siti di massima ricaduta e i rispettivi controlli presentano, in genere, valori di NIPA inferiori in inverno rispetto all'estate, perchè i NIPA si formano in atmosfera per nitrificazione degli IPA mediante reazioni secondarie fotochimiche (e



termodinamiche) in condizioni di elevata temperatura come accade in estate.

<b>NIPA</b>		
<b>1-nitronaftalene + 9-nitroantracene + 9-nitrofenantrene + 1-nitropirene (ng/m<sup>3</sup>)</b>		
	Estate	Inverno
<b>Max ricaduta Est</b>	0.541 ± 0.477	0.016 ± 0.013**
<b>Controllo Est</b>	0.043 ± 0.031	0.021 ± 0.023*
<b>Max ricaduta Ovest</b>	0.190 ± 0.091	0.090 ± 0.080**
<b>Controllo Ovest</b>	0.191 ± 0.133	0.158 ± 0.150
<b>Controllo distanza</b>	0.057 ± 0.156	0.026 ± 0.019
<b>Fondo urbano</b>	0.008	0.035 ± 0.029*
<b>Max fonti</b>	0.030 ± 0.027	0.015 ± 0.013
<b>Min ricaduta</b>	0.008	0.040 ± 0.030**

**Tabella 7.2:** Confronti estate vs inverno relativi alla concentrazione di NIPA. I dati sono espressi come concentrazione media ± SD.  
 \*\*p<0.01 rispetto al valore misurato nella campagna estiva, t-test.  
 \*p<0.05 rispetto al valore misurato nella campagna estiva, t-test.

Per il confronto dei B(a)P equivalenti si è sommato, in seguito alle considerazioni fatte per i NIPA, il contributo dei singoli IPA (che sono gli stessi per entrambe le campagne di monitoraggio) e quello dell' 1-nitropirene (**Tab. 7.3**).

IPA		
PM <sub>2.5</sub>	Estate	Inverno
	<b>IPA +1-nitropirene B(a)P eq (ng/m<sup>3</sup>)</b>	
<b>Max ricaduta Est</b>	0.093 ± 0.040	1.038 ± 0.666
<b>Controllo Est</b>	0.058 ± 0.018	2.146 ± 1.180
<b>Max ricaduta Ovest</b>	0.075 ± 0.015	0.642 ± 0.903
<b>Controllo Ovest</b>	0.104 ± 0.037	0.877 ± 0.732
<b>Controllo distanza</b>	0.061 ± 0.019	0.848 ± 0.437
<b>Fondo urbano</b>	0.051 ± 0.008	0.647 ± 0.528
<b>Max fonti</b>	0.061 ± 0.015	1.345 ± 0.832
<b>Min ricaduta</b>	0.042 ± 0.004	1.166 ± 0.384

**Tabella 7.3:** Confronti estate vs inverno relativi al valore trasformato in B(a)P equivalenti.

I dati sono espressi come concentrazione media ± SD.

I confronti relativi ai B(a)P equivalenti risultano essere **tutti statisticamente significativi (p<0.01) al t-test**. I valori riferiti alla campagna invernale sono maggiori di quelli del monitoraggio condotto in estate come minimo di un ordine di grandezza. Di conseguenza anche nell'analisi del rischio cancerogeno si rileva un aumento, di un ordine di grandezza, dell'incremento di rischio di sviluppare tumore in seguito all'inalazione cronica (per tutta la vita) di B(a)P e di miscele complesse di idrocarburi policiclici aromatici (B(a)P equivalenti).

I livelli di PCB, invece, risultano simili e paragonabili nei due differenti periodi di campionamento (**Tab. 7.4**).

<b>PCB</b>		
<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>Estate</b>	<b>Inverno</b>
	<b>PCB tot (pg/m<sup>3</sup>)</b>	
<b>Max ricaduta Est</b>	74.868 ± 25.345	106.107 ± 77.443
<b>Controllo Est</b>	62.982 ± 23.235	128.701 ± 106.361*
<b>Max fonti</b>	73.660 ± 27.614	117.220 ± 103.212

**Tabella 7.4:** Confronti estate vs inverno relativi alla concentrazione di PCB totali.

\*p<0.05 rispetto al valore misurato nella campagna estiva, t-test.

I dati sono espressi come concentrazione media ± SD.

Per quanto riguarda le concentrazioni di diossine e furani si osserva un aumento significativo per tutti i siti ( $p < 0.01$ , t-test) nella campagna invernale rispetto a quella estiva (**Tab. 7.5**) ma, in seguito alla trasformazione del dato in TCDD equivalenti, valore più predittivo per gli effetti tossici e successivamente all'apporto dei PCB diossino-simili, come TCDD equivalenti, tale significatività viene persa (**Tab. 7.6**). Di nuovo non si osservano nei siti di massima ricaduta (Est ed Ovest) valori superiori ai siti dei controlli (rispettivamente Est ed Ovest).

<b>Diossine e furani</b>		
<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>Estate</b>	<b>Inverno</b>
	<b>PCDD+PCDF tot (fg/m<sup>3</sup>)</b>	
<b>Max ricaduta Est</b>	223.677 ± 114.998	612.387 ± 348.427
<b>Controllo Est</b>	231.641 ± 177.182	506.304 ± 270.583
<b>Max fonti</b>	179.098 ± 84.585	599.410 ± 264.980

**Tabella 7.5:** Confronti estate vs inverno relativi alla concentrazione di PCDD+PCDF totali.

I dati sono espressi come concentrazione media ± SD.

<b>Diossine, furani e PCB diossino-simili</b>		
<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>Estate</b>	<b>Inverno</b>
	<b>PCDD+PCDF+DL-PCB TCDD eq (fg/m<sup>3</sup>)</b>	
<b>Max ricaduta Est</b>	17.354 ± 12.962	17.803 ± 6.636
<b>Controllo Est</b>	17.206 ± 4.850	24.292 ± 13.130
<b>Max fonti</b>	15.767 ± 5.411	23.723 ± 13.570

**Tabella 7.6:** Confronti estate vs inverno relativi al valore trasformato in TCDD equivalenti.

I dati sono espressi come concentrazione media ± SD.

In riferimento alla valutazione del rischio cancerogeno si può affermare che i livelli di B(a)P misurati in entrambe le campagne di monitoraggio sono inferiori al valore limite posto su base annua (1 ng/m<sup>3</sup>) presente nel riferimento normativo (D.Lgs 155/10). In particolare le concentrazioni di B(a)P misurate durante la campagna di monitoraggio estiva sono di 2 ordini di grandezza inferiori rispetto a tale limite regolatorio e quelle relative alla campagna invernale sono inferiori di circa 1 ordine di grandezza (**Tab. 7.7**).

<b>IPA</b>		
<b>PM<sub>2.5</sub></b>	<b>Estate</b>	<b>Inverno</b>
<b>B(a)P come tale (ng/m<sup>3</sup>)</b>		
<b>Max ricaduta Est</b>	0.010 ± 0.008	0.363 ± 0.235
<b>Controllo Est</b>	0.013 ± 0.007	0.929 ± 0.448
<b>Max ricaduta Ovest</b>	0.011 ± 0.006	0.176 ± 0.144
<b>Controllo Ovest</b>	0.018 ± 0.016	0.338 ± 0.226
<b>Controllo distanza</b>	0.012 ± 0.005	0.301 ± 0.186
<b>Fondo urbano</b>	0.009 ± 0.002	0.269 ± 0.184
<b>Max fonti</b>	0.016 ± 0.009	0.190 ± 0.151
<b>Min ricaduta</b>	0.004 ± 0.002	0.402 ± 0.152

**Tabella 7.7:** Confronti estate vs inverno relativi alla concentrazione di B(a)P come tale.

I dati sono espressi come concentrazione media ± SD.

**Differenza statisticamente significativa (p<0.01) al t-test per tutti i siti analizzati.**

Per quanto riguarda il valore trasformato di B(a)P equivalenti nella campagna invernale, l'applicazione dell'UR di cancro porta a stimare un incremento del rischio dell'ordine di quello definito in letteratura (di  $1 \times 10^{-4}$  per esposizione a  $1 \text{ ng/m}^3$ ) (WHO, 2000; CCTN, 1991) e inferiore di circa 1 ordine di grandezza nella campagna estiva (**Tab. 7.8**).

<b>Rischio di cancro</b>		
<b>PM<sub>2,5</sub></b>	<b>Estate</b>	<b>Inverno</b>
	<b>B(a)P eq</b>	
<b>Max ricaduta Est</b>	0.93 x10 <sup>-5</sup>	1.04 x10 <sup>-4</sup>
<b>Controllo Est</b>	0.58 x10 <sup>-5</sup>	2.15 x10 <sup>-4</sup>
<b>Max ricaduta Ovest</b>	0.75 x10 <sup>-5</sup>	0.64 x10 <sup>-4</sup>
<b>Controllo Ovest</b>	1.04 x10 <sup>-5</sup>	0.88 x10 <sup>-4</sup>
<b>Controllo distanza</b>	0.61 x10 <sup>-5</sup>	0.85 x10 <sup>-4</sup>
<b>Fondo urbano</b>	0.51 x10 <sup>-5</sup>	0.65 x10 <sup>-4</sup>
<b>Max fonti</b>	0.61 x10 <sup>-5</sup>	1.35 x10 <sup>-4</sup>
<b>Min ricaduta</b>	0.42 x10 <sup>-5</sup>	1.17 x10 <sup>-4</sup>

**Tabella 7.8:** Rischio di cancro relativo al valore trasformato in B(a)P equivalenti.

Sulla base dei dati presentati relativi agli IPA, può essere condotto un confronto, per il PM<sub>2,5</sub>, con il precedente monitoraggio dell'inceneritore effettuato nel 2006 ([http://www.provincia.bologna.it/ambiente/Engine/RAServeFile.php/f/Progetti/valutazionerischio\\_frullo.pdf](http://www.provincia.bologna.it/ambiente/Engine/RAServeFile.php/f/Progetti/valutazionerischio_frullo.pdf)). Nel periodo estivo presso il sito C, corrispondente all'attuale Max Ricaduta Est, il valore di B(a)P equivalenti risultava essere pari a 0.048 ng/m<sup>3</sup> e quindi paragonabile a quello stimato in estate 2009 (Max Ricaduta Est: 0.060 ng/m<sup>3</sup>).

Per quanto riguarda la campagna invernale il valore relativo al campionamento del 2006 (Sito C: 2.57 ng/m<sup>3</sup>) è più elevato rispetto a quello del 2009 (Max Ricaduta Est: 1.038 ng/m<sup>3</sup>). Appare quindi un miglioramento che potrebbe essere dovuto, solo in parte, alla modesta differenza in termini di durata del periodo di campionamento, come descritto per il PM.

La stima del rischio cancerogeno relativa al valore trasformato in TCDD equivalenti ha mostrato una situazione analoga tra le due campagne (estiva ed invernale) e valori sempre inferiori a 1 su 1 milione (**Tab. 7.9**). Si rimarca che si tratta di miscele complesse, comprendenti, oltre alla diossina TCDD, altri composti e che le stime di rischio non possono tener conto delle possibili interazioni di tutte le componenti. Tuttavia la stima effettuata sommando tutti i composti con meccanismo d'azione simile dovrebbe rendere conto del possibile effetto additivo.

<b>Rischio di cancro</b>		
<b>PM<sub>2,5</sub></b>	<b>Estate</b>	<b>Inverno</b>
	<b>PCDD+PCDF+DL-PCB TCDD eq</b>	
<b>Max ricaduta Est</b>	6.59 x10 <sup>-7</sup>	6.77 x10 <sup>-7</sup>
<b>Controllo Est</b>	6.54 x10 <sup>-7</sup>	9.23 x10 <sup>-7</sup>
<b>Max fonti</b>	5.99 x10 <sup>-7</sup>	9.01 x10 <sup>-7</sup>

**Tabella 7.9:** Rischio di cancro relativo al valore trasformato in B(a)P equivalenti.

Quando i TCDD equivalenti vengono trasformati da concentrazioni in aria a dose per kg di p.c./die (moltiplicando per 30 m<sup>3</sup>/die e dividendo per 60 kg di peso corporeo, nell'assunzione di un assorbimento polmonare di default pari al 100%) i valori variano da circa 7,5 a circa 12 fg/kg p.c./die. Se confrontati con il TDI, per le diossine espresso come TEQ (2 pg/kg di p.c./die ovvero 2000 fg/kg p.c./die), tali valori, riferiti alla sola inalazione, sono inferiori rispetto al valore di TDI di più di due ordini di grandezza e rendono trascurabile la presenza di diossine nell'aria dei vari siti ai fini di qualsiasi effetto tossico (anche tossicità dello sviluppo) o cancerogeno, come trascurabile

è il contributo delle diossine-equivalenti al rischio cancerogeno precedentemente stimato e riportato in **Tabella 7.9**.

Dal confronto con il precedente monitoraggio dell'inceneritore effettuato nel 2006 si evidenzia anche per le diossine un miglioramento della qualità dell'aria. Nel periodo invernale presso il sito C, infatti, il valore di TCDD equivalenti risultava essere pari a 44.12 fg/m<sup>3</sup> e quindi superiore a quello stimato nell'inverno 2009 a Max Ricaduta Est (16.58 fg/m<sup>3</sup>).

### *Considerazioni generali*

I risultati ottenuti per tutti gli *endpoint* biologici saggiati sono concordi nel mostrare un profilo tossicologico simile, anche se non completamente identico, nei campioni di aria prelevati nel sito di massimo impatto dell'inceneritore (Max Ricaduta Est) e nel sito appartenente allo stesso dominio, ma non interessato dalla ricaduta delle polveri dell'impianto (Controllo Est). Quest'ultimo anzi è risultato il campione più efficace nell'indurre effetti rilevabili, come dimostrano i test di citotossicità, oltre ad essere quello che maggiormente comporta modulazioni a livello trascrizionale rispetto agli altri siti valutati.

Anche l'analisi dei microinquinanti è in linea con quanto affermato. La caratterizzazione chimica del particolato evidenzia infatti, in relazione per esempio agli IPA totali (e ai trasformati in B(a)P equivalenti) differenze significative nei campionamenti presso i siti Max Ricaduta (Est ed Ovest) rispetto a Controllo Est e Controllo Ovest, dove le concentrazioni di tali inquinanti risultano più elevate, anche se questi ultimi dovrebbero rappresentare i "bianchi" dei punti di campionamento di massima ricaduta delle polveri.



La valutazione del rischio cancerogeno effettuata sull'analisi dei microinquinanti in tutti i siti, inoltre, non mostra situazioni preoccupanti legate alla predizione di un eccesso di rischio di tumori imputabili all'attività dell'impianto di incenerimento.

Si può dunque concludere dai risultati ottenuti in questo studio che l'impatto sulla qualità dell'aria dell'impianto di termovalorizzazione di Bologna sembra non sussistere.

È, tuttavia, da tenere in considerazione il fatto che l'inceneritore in oggetto è un impianto relativamente nuovo (entrato in funzione nel 2005, in sostituzione di quello vecchio), e sottoposto, come tutti gli impianti in esercizio, a un monitoraggio permanente ([http://www.provincia.bologna.it/ambiente/Engine/RAServeFile.php/f/Progetti/valutazionerischio\\_fruzzo.pdf](http://www.provincia.bologna.it/ambiente/Engine/RAServeFile.php/f/Progetti/valutazionerischio_fruzzo.pdf)) quindi tali risultati non possono essere generalizzati per altre strutture più vecchie e impattanti.

Nella valutazione della qualità dell'aria l'approccio integrato dell'analisi tossicologica tramite test di cancerogenesi *in vitro* e analisi trascrizionale, sul quale si è basato il presente studio, costituisce un'innovazione per il monitoraggio ambientale che ben si inserisce nella pressante richiesta da parte dell'Unione Europea dello sviluppo di test alternativi per la predizione del rischio da inquinanti ambientali.

La valutazione del rischio, infine, ha consentito un'interpretazione più estesa della caratterizzazione chimica dei microinquinanti e ha rafforzato i risultati ottenuti nelle indagini eseguite con gli approcci biologici e biomolecolari.

Va comunque detto che, ai fini della conoscenza dei rischi ambientali della popolazione residente, sono necessarie ulteriori indagini.

Sarebbe utile, per esempio, un'analisi dettagliata di altre fonti inquinanti e a maggiore impatto, quale il traffico veicolare, da comparare ai profili tossicologici e genici ottenuti per i siti oggetto dello studio, e in particolar modo i siti Max Ricaduta Est e Controllo Est, e da includere nella procedura di valutazione del rischio per quantificarne il peso all'interno di una più generale esposizione ad aria inquinata.

I metodi utilizzati nei test biologici potrebbero essere completati aggiungendo lo studio di altre variabili all'interno dell'esperimento. Per esempio, lo studio della cancerogenesi *in vitro* potrebbe avvantaggiarsi di uno schema sperimentale di iniziazione/promozione, che risulta molto utile in caso di esposizioni a basse dosi a cancerogeni non mutageni o a cancerogeni incompleti. Nello studio di tossicogenomica sarebbe molto utile poter inserire uno schema sperimentale a più dosi e con una esposizione prolungata e a più tempi (*time-course*), e saggiare la sensibilità e la risposta in seguito all'esposizione a campioni ambientali di altri modelli cellulari, rappresentativi di organi bersaglio.

Una comprensione migliore della tossicità relativa e dei diversi effetti legati a PM originato da sorgenti differenti permetterà di concentrare gli sforzi per l'abbattimento mirato di alcune sorgenti e nello stesso tempo di effettuare misure di controllo più efficaci per ridurre l'incremento delle patologie legate all'inquinamento atmosferico.

## Bibliografia

1. Abbas I, Garçon G, Saint-Georges F, Andre V, Gosset P, Billet S, Goff JL, Verdin A, Mulliez P, Sichel F, Shirali P, 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model. *J Appl Toxicol*; 10:1002-1722.
2. Ackermann-Liebrich U, Leuenberger P, Schwartz J, Schindler C, Monn C, Bolognini G, Bongard JP, Brandli O, Domenighetti G, Elsasser S *et al.*, 1997. Lung function and long term exposure to air pollutants in Switzerland. *Am J Respir Crit Care Med*; 155:122-129.
3. Agabiti N, Mallone S, Forastiere F, Corbo G, Renzoni E, Sestini P *et al.*, 1999. The impact of parental smoking on asthma and wheezing. *Epidemiology*; 10:692-8.
4. Archer VE, 1990. Air pollution and fatal lung disease in three Utah counties. *Arch Environ Health*; 45:325-334.
5. Asada S, Sasaki K, Tanaka N, Takeda K, Hayashi M, Umeda M, 2005. Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells). *Mutation Research*; 588,7-21.
6. Atkinson RW, Anderson HR, Sunyer J, Ayres J, Baccini M, Vonk JM, Boumghar A, Forastiere F, Forsberg B, Touloumi G, *et al.*, 2001. Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions: results from the APHEA 2 project. *Am J Respir Crit Care Med*; 164:1860-1866.
7. ATS (American Thoracic Society), 2000: What constitute an adverse health effect of air pollution? Official statement

of the American Thoracic Society. Am J Respir Care Med; 161:665-673.

8. ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1995. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). U.S. Department of Health & Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
9. Biggeri A, Bellini P, Terracini B. the Italian MISA Group, 2001. Metanalisi italiana degli studi sugli effetti acuti dell'inquinamento atmosferico. Epidemiol Prev; 25:1-71.
10. Bobak M, Leon DA, 1999. The effect of air pollution on infant mortality appears specific for respiratory causes in the postneonatal period. Epidemiology; 10:666-670.
11. Boeglin ML, Wessels D, Henshel D, 2006. An investigation of the relationship between air emissions of volatile organic compounds and the incidence of cancer in Indiana counties. Environ Res; 100(2):242-54.
12. Boffetta P, Dosemeci M, Gridley G, Bath H, Moradi T, Silverman D, 2001. Occupational exposure to diesel engine emissions and risk of cancer in Swedish men and women. Cancer Causes Control; 12(4):365-74.
13. Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, Houcine O, Gendron MC, Chévrier M, Jouvenot G, Coste A, Aubier M, Marano F, 1999. Diesel exhaust particles are taken up by human airway epithelial cells *in vitro* and alter cytokine production. Am J Physiol; 276(4 Pt 1):L604-13.
14. Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C, 2007. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. Ann Oncol; 18(3):431-46.

15. Bosio A, Knorr C, Janssen U, Gebel S, Hausmann H-J, Muller T, 2002. Kinetics of gene expression profiling in Swiss 3T3 cells exposed to aqueous extracts of cigarette smoke. *Carcinogenesis*; 23:741-748.
16. Brunekreef B, Forsberg B, 2005. Epidemiological evidence of effects of coarse airborne particles on health. *Eur Respir J*; 26(2):309-18.
17. California EPA, 2005. Air toxic hot spots program. Risk assessment guidelines. Part II. Technical support document for describing available cancer potency factors. OEHHA, Air toxicology and epidemiology section, Budroee JD *et al.*, May 2005.
18. Carbone M, Pass HI, 2004. Multistep and multifactorial carcinogenesis: when does a contributing factor become a carcinogen? *Sem Cancer Biol*; 14:399-405.
19. CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment), 2008. Canadian Soil Quality Guidelines for Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Environmental and Human Health Effects). Scientific Supporting Document, pp 106-108.
20. CCTN (Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale). Parere della CCTN sugli idrocarburi policiclici aromatici. Raccolta dei pareri espressi dalla CCTN nel 1991. Serie Relazioni, Istituto Superiore di Sanità 92/1, pp. 56-62. Roma 28.11.1991.
21. Churchill GA, 2002. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nature genetics supplement*; 32:290-295.

22. Clapp RW, Jacobs MM, Loechler EL, 2008. Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005-2007. *Rev Environ Health*; 23(1):1-37.
23. Colacci A, Perocco P, Vaccari M, Mazzullo M, Albini A, Parodi S, Taningher M, Grilli S, 1990. *In vitro* transformation of BALB/c 3T3 cells by 1,1,2,2-tetrachloroethane. *Japanese Journal of Cancer Research*; 81,786-792.
24. Colacci A, Albini A, Melchiori A, Nanni P, Nicoletti G, Noonan D, Parodi S and Grilli S, 1993. Induction of a malignant phenotype in BALB/c 3T3 cells by 1,1,2,2-tetrachloroethane. *Int. J. Oncol*; 2:937-945.
25. Colacci A, Perocco P, Vaccari M, Da Vià C, Silingardi P, Manzini E, Horn W, Bartoli S, Grilli S, 1995. 1,2-dibromoethane as initiating agent for cell transformation. *Japanese Journal of Cancer Research*; 86,168-173.
26. Colacci A, Vaccari M, Perocco P, Da Vià C, Silingardi P, Manzini E, Horn W, Grilli S, 1996. Enhancement of BALB/c 3T3 cells transformation by 1,2-dibromoethane promoting effect. *Carcinogenesis*; 17(2),225-231.
27. Colacci A, Vaccari M, Silingardi P, Horn W, Mascolo MG, Perdichizzi S, Rotondo F, Poluzzi V, Belladonna V, Grilli S, 2007. *In vitro* endpoints to profile risks associated with waste incineration. EUROTOX 2007 - 44th Congress of the European Society of Toxicology, Amsterdam, The Netherlands, October 7-10 2007. *Toxicology Letters*, 172S, p. S113.
28. Combes R, Balls M, Curren R, Fischbach M, Fusenig N, Kirkland D, Lasne C, Landolph J, LeBoeuf R, Marquardt H, McCormick J, Müller L, Rivedal E, Sabbioni E, Tanaka N, Vasseur P and Yamasaki H, 1999. Cell transformation

assays as predictors of human carcinogenicity. The report and recommendations of ECVAM Workshop XX. In: M. Balls (ed.) ATLA, 27,745-767.

29. Courter LA, Luch A, Musafia-Jeknic T, Arlt VM, Fischer K, Bildfell R, Pereira C, Phillips DH, Poirier MC, Baird WM, 2008. The influence of diesel exhaust on polycyclic aromatic hydrocarbon-induced DNA damage, gene expression, and tumor initiation in Sencar mice *in vivo*. *Cancer Lett*; 265(1):135-47.
30. Crouse DL, Goldberg MS, Ross NA, Chen H, Labrèche F, 2010. Postmenopausal breast cancer is associated with exposure to traffic-related air pollution in Montreal, Canada: a case-control study. *Environ Health Perspect*; 118(11):1578-83.
31. de Hartog JJ, Hoek G, Peters A, Timonen KL, Ibalid-Mulli A, Brunekreef B, Heinrich J, Tiittanen P, van Wijnen JH, Kreyling W, Kulmala M, Pekkanen J, 2003. Effects of fine and ultrafine particles on cardiorespiratory symptoms in elderly subjects with coronary heart disease: the ULTRA study. *Am J Epidemiol*;157(7):613-23.
32. Delfino RJ, Sioutas C, Malik S, 2005. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect*; 113(8):934-46.
33. Di Giampaolo L, Quecchia C, Schiavone C, Cavallucci E, Renzetti A, Braga M, Di Gioacchino M, 2011. Environmental pollution and asthma. *Int J Immunopathol Pharmacol*; 24(1 Suppl):31S-38S.
34. Dockery DW, Pope CA 3<sup>rd</sup>, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG, Speizer FA, 1993. An association

between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med*; 29:1753-1759.

35. Dominici F, Peng RD, Bell ML, Pham L, McDermott A, Zeger SL, Samet JM, 2006. Fine particulate air pollution and hospital admission for cardiovascular and respiratory diseases. *JAMA*; 295:1127-1134.
36. Draghici S, Khatri P, Tarca AL, Amin K, Done A, Voichita C, Georgescu C, and Romero R, 2007. A system biology approach for pathway level analysis. *Genome Research*; 17:1537-1545.
37. Elder A, Oberdorster G, 2006. Translocation and effects of ultrafine particles outside of the lung. *Clin Occup Environ Med*; 5(4):785-96.
38. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E, 2010. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal of Cancer*; 46(4):765-781.
39. Ferm M, Watt J, O'Hanlon S, De Santis F, Varotsos C, 2006. Deposition measurement of particulate matter in connection with corrosion studies. *Anal Bioanal Chem*; 384(6):1320-30.
40. Forastiere F, 2002. Gli effetti dell'inquinamento atmosferico sulla salute. Dipartimento di Epidemiologia ASL Roma E. Manoscritto non pubblicato.
41. Forastiere F, Peters A, Kelly F, Holgate S, 2006. Nitrogen Dioxide. In: *Air quality guidelines - global update 2005: particular matter, ozone, nitrogen dioxide and sulphur dioxide*. WHO Regional Office for Europe; 331-94.
42. Frampton MW, Ghio AJ, Samet JM, Carson JL, Carter JD, Devlin RB, 1999. Effects of aqueous extracts of PM(10)



filters from the Utah valley on human airway epithelial cells. *Am J Physiol*; 277(5 Pt 1):L960-7.

43. Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Van Bree C, 2006. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature Protocols*; 1:2315-2319.
44. Fusco D, Forastiere F, Michelozzi P, Spadea T, Ostro B, Arcà M, Perucci CA, 2001. Air pollution and hospital admissions for respiratory conditions in Rome, Italy. *Eur Respir J*; 17(6):1143-50.
45. Galbraith D, Gross SA, Paustenbach D, 2010. Benzene and human health: A historical review and appraisal of associations with various diseases. *Crit Rev Toxicol*; 40 Suppl 2:1-46.
46. Gauderman WJ, Gilliland GF, Vora H, Avol E, Stram D, McConnell R, Thomas D, Lurmann F, Margolis HG, Rappaport EB, Berhane K, Peters JM, 2002. Association between air pollution and lung function growth in southern California children: results from a second cohort. *Am J Respir Crit Care Med*; 166(1):76-84.
47. Grilli S, 1992. Stima del Rischio Cancerogeno. Aspetti scientifici e applicativi. *Ecologia e scienze ambientali*. CLUEB Bologna.
48. Guengerich FP, 1985. Enzymatic activation of chemicals to toxic metabolites. *CRC Crit Rev Toxicol*; 14 (3):259-307.
49. Guengerich FP, 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol*; 14(6):611-650.
50. Guo J, Kauppinen T, Kyyrönen P, Heikkilä P, Lindbohm ML, Pukkala E, 2004. Risk of esophageal, ovarian,

testicular, kidney and bladder cancers and leukemia among finnish workers exposed to diesel or gasoline engine exhaust. *Int J Cancer*; 111(2):286-92.

- 51.** Hamed A, Joutsensaari J, Mikkonen S, Sogacheva L, Dal Maso M, Kulmala M, Cavalli F, Fuzzi S, Facchini MC, Decesari S, Mircea M, Lehtinen KEJ and Laaksonen A, 2007. Nucleation and growth of new particles in Po Valley, Italy *Atmos. Chem. Phys*; 7:355-376.
- 52.** Hanahan D, Weinberg RA, 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*; 100:57-70.
- 53.** Hayashi K, Sasaki K, Asada S, Tsuchiya T, Hayashi M, Yoshimura I, Tanaka N, Umeda M, 2008. Technical modification of the BALB/c 3T3 cell transformation assay: the use of serum-reduced medium to optimise the practicability of the protocol. *Altern Lab Anim. Dec*; 36(6):653-65.
- 54.** Heguy A, O'Connor TP, Luettich K, Worgall S, Ciecuch A, Harvey BG, Hackett NR, Crystal RG, 2006. Gene expression profiling of human alveolar macrophages of phenotypically normal smokers and nonsmokers reveals a previously unrecognized subset of genes modulated by cigarette smoking. *J Mol Med*; 84:318-328.
- 55.** IARC/NCI/EPA Working Group, 1985. Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols. *Cancer Research*; 45:2395-2399.
- 56.** IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, 2010. Some non-heterocyclic aromatic hydrocarbons and some related exposure. Vol. 92, pp 1-853. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

57. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, 2010a. Some Aromatic Amines, Organic Dyes, and Related Exposures. Vol. 99, pp 34-36. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
58. Jansen KL, Larson TV, Koenig JQ, Mar TF, Fields C, Stewart J, Lippmann M, 2005. Associations between health effects and particulate matter and black carbon in subjects with respiratory disease. *Environ Health Perspect*; 113(12):1741-6.
59. Ji J, Granström C, Hemminki K, 2005. Occupational risk factors for kidney cancer: a cohort study in Sweden. *World J Urol*; 23(4):271-8.
60. Kakunaga T, 1985. Critical review of the use of established cell lines for *in vitro* cell transformation, in Kakunaga, T. and Yamasaki, H. (Eds.), Transformation assay of established cell lines: mechanisms and application. IARC Scientific Publications 67, Lyon, 55-69.
61. Kang Y, Cheung KC, Wong MH, 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in different indoor dusts and their potential cytotoxicity based on two human cell lines. *Environment International*; 36,542-547.
62. Katsouyanni K, Samet JM, Anderson HR, Atkinson R, Le Tertre A, Medina S, Samoli E, Touloumi G, Burnett RT, Krewski D, Ramsay T, Dominici F, Peng RD, Schwartz J, Zanobetti A; HEI Health Review Committee, 2009. Air pollution and health: a European and North American approach (APHENA). *Res Rep Health Eff Inst*; Oct(142):5-90.
63. Kawanishi M, Watanabe T, Hagio S, Ogo S, Shimohara C, Jouchi R, Takayama S, Hasei T, Hirayama T, Oda Y, Yagi T, 2009. Genotoxicity of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, a

novel mutagen in ambient air and surface soil, in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *Mutagenesis*; 24(3):279-84.

64. Kelly FJ, Fussell JC, 2011. Air pollution and airway disease. *Clin Exp Allergy*; 41(8):1059-71.
65. Kendzierski CM, Zhang Y, Lan H, Attie AD, 2003. The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments. *Biostatistics*; 4:465-477.
66. Kolodner RD, 1996. Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes Dev*; 15;10(12):1433-42.
67. Krzyzanowski M, Cohen A, 2008. Update of WHO air quality guidelines. *Air Qual Atmos Health*; 1:7-13.
68. LeBoeuf R, Kerckaert KA, Aardema MJ, Isfort RJ, 1999. Use of Syrian hamster embryo and BALB/c 3T3 cell transformation for assessing the carcinogenic potential of chemicals, in McGregor DB, Rice JM, Venitt S (Eds.). *The use of short and medium term tests for carcinogens and data on genetic effects in carcinogenic hazard evaluation*. IARC Scientific Publications 146, Lyon, 1999, pp.409-425.
69. Levin Z and Cotton WR, 2009. *Aerosol Pollution Impact on Precipitation - A Scientific Review*, Springer, 386 pp., ISBN: 978-1-4020-8689-2.
70. Lewalle P, 1999. Risk Assessment Terminology: Methodological Considerations and Provisional Results. *Terminology Standardization and Harmonization*; 11(1-4),1-28.
71. Lilienblum W, Dekant W, Foth H, Gebel T, Hengstler JG, Kahl R, Kramer PJ, Schweinfurth H, Wollin K-M, 2008.

Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European chemicals legislation (REACH). *Archives of Toxicology* 82, 211-236.

72. Lodivici M and Bigagli E, 2011. Oxidative stress and air pollution exposure. *J Toxicol*; 2011:487074.
73. Maguhn J, Karg E, Kettrup A, Zimmermann R, 2003. On-line analysis of the size distribution of fine and ultrafine aerosol particles in flue and stack gas of a municipal waste incineration plant: effect of dynamic process control measures and emission reduction devices. *Environ Sci Technol*; 37,4761-4770.
74. Mahadevan B, Keshava C, Musafia-Jeknic T, Pecaj A, Weston A, Baird WM, 2005. Altered gene expression patterns in MCF-7 cells induced by the urban dust particulate complex mixture standard reference material 1649a. *Cancer Res*; 65:1251-1258.
75. Marconi A, 2003. Materiale particellare aerodisperso: definizioni, effetti sanitari, misura e sintesi delle indagini ambientali effettuate a Roma. *Ann Ist Super Sanità*; 39(3):329-42.
76. Mascolo MG, Perdichizzi S, Rotondo F, Morandi E, Guerrini A, Silingardi P, Vaccari M, Grilli S, Colacci A, 2010. BALB/c 3T3 transformation assay for the prediction of carcinogenic potential of chemicals and environmental mixtures. *Toxicology in vitro*; 24:1292-1300.
77. Matthews EJ, Spalding JW, Tennant RW, 1993a. Transformation of BALB/c 3T3 cells: IV. Rank ordered potency of 24 chemical responses detected in a sensitive new procedure. *Environmental Health Perspectives*; 101,319-345.

78. Matthews EJ, Spalding JW, Tennant RW, 1993b. Transformation of BALB/c 3T3 cells: V. Transformation responses of 168 chemicals compared with mutagenicity in Salmonella and carcinogenicity in rodent bioassays. *Environmental Health Perspectives*; 101,347-482.
79. Mattison DR, 2010. Environmental exposures and development. *Curr Opin Pediatr*; 22(2):208-18.
80. Maunders H, Patwardhan S, Phillips J, Clack A, Richter A, 2007. Human bronchial epithelial cell transcriptome: gene expression changes following acute exposure to whole cigarette smoke *in vitro*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 292:L1243-L1256.
81. McDonald JD, Eide I, Seagrave J, Zielinska B, Whitney K, Lawson DR, Mauderly JL, 2004. Relationship between Composition and Toxicity of Motor Vehicle Emission Samples. *Environ Health Perspect*; 112(15):1527-1538.
82. Miller KA, Siscovick DS, Sheppard L, Shepherd K, Sullivan JH, Anderson GL, Kaufman JD, 2007. Long-term exposure to air pollution and incidence of cardiovascular events in women. *New Engl J Med*; 356,447-458.
83. MOE (Ministry of the Environment), 1997. Scientific criteria document for multimedia standard development. Polycyclic aromatic Hydrocarbons (PAH). Part 1: Hazard identification and dose-response assessment. MOE, Toronto, Ontario.
84. Muller P, 2002. Potential For Occupational and Environmental Exposure to Ten Carcinogens in Toronto, Tox Probe Inc.

85. Nemmar A, Hoet PH, *et al.* 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*; 105:411-414.
86. OECD, 2007. Detailed review paper on cell transformation assay for detection of chemicals carcinogens. *Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment*; 31:1-164.
87. OECD, 2009. Test No. 453: Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing.
88. Ohmori K, Umeda M, Tanaka N, Takagi H, Yoshimura I, Sasaki K, Asasda S, Sakai A, Araki H, Asakura M, Baba H, Fushiwaki Y, Hamada S, Kitou N, Nakamura T, Nakamura Y, Oishi H, Sasaki S, Shimada S, Tsuchiya T, Uno Y, Washizuka M, Yajima, S, Yamamoto Y, Yamamura E, Yatsushiro T, 2005. Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in the Environmental Mutagen Society of Japan. An inter-laboratory collaborative study by the Non-Genotoxic Carcinogen Study Group in Japan, on a cell transformation assay for tumour promoters using Bhas 42 cells. *Altern Lab Anim*; Dec;33(6):619-39.
89. Paolini M, Biagi GL, Bauer C, Cantelli-Forti G, 1992. On the nature of non-genotoxic carcinogens. A unified theory including NGCs, co-carcinogens and promoters. *Mutat Res*; 281(4):245-246.
90. Paolini M, Biagi GL, Cantelli-Forti G, Bauer C, 1994. Further mechanisms of non-genotoxic carcinogenesis. *Trends Pharmacol Sciences*; 15:322-323.
91. Peacock JL, Symonds P, Jackson P, Bremner SA, Scarlett JF, Strachan DP *et al.*, 2003. Acute effects of winter air

pollution on respiratory function in schoolchildren in southern England. *Occup Environ Med*; 60:82-89.

92. Perocco P, Colacci A, Santucci MA, Vaccari M, Grilli S, 1991. Transforming activity of ethylene dibromide in BALB/c 3T3. *Res Comm Chem Pathol Pharmacol*; 73,159-172.
93. Pope CA 3<sup>rd</sup>, 2000. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environ Health Perspect*; 108(4):713-23.
94. Pope CA 3<sup>rd</sup>, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD, 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*; 287(9):1132-41.
95. Pope CA 3<sup>rd</sup> and Dockery DW, 2006. Health effects of fine particulate air pollution: lines that connect. *J. Air & Waste Manage. Assoc*; 56;709-742.
96. Pope CA 3<sup>rd</sup>, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE, Heath JCW, 1995. Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am J Respir Crit Care Med*;151:669-674.
97. Pott P, 1775. Chirurgical observations relative to the cancer of the scrotum. Reprinted in *Natl Cancer Inst Monograph*; 10:7-13, 1963.
98. Prospero JM, Olmez I, and Ames M, 2001. Al and Fe in PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub> suspended particles in South-Central Florida: The impact of the long range transport of African mineral dust. *Water Air Soil Pollut*; 125,291-317.
99. Putaud JP, Raes F, Van Dingenen R, Brüeggemann E, Facchini MC, Decesari S, Fuzzi S, Gehrig R, Hueglin C,



Laj P, Lorbeer G, Maenhaut W, Mihalopoulos N, Mueller K, Querol X, Rodriguez S, Wiedensohler A *et al.*, 2004. A European aerosol phenomenology-2: chemical characteristics of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe. *Atmospheric Environment*; 38(16):2579-2595.

100. Raes F, Van Dingenen R, Cuevas E, Van Velthoven P, and J. Prospero JM, 1997. Observations of aerosols in the free troposphere and marine boundary layer of the subtropical N.E. Atlantic: discussion of the processes determining their size distribution, *J Geophys Res*; 102(DD17);21,315-21,328.
101. Regulation (EC) 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006, concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Official Journal of the European Union*; 30/12/2006; L396/15.
102. Reich BJ, Fuentes M, Burke J, 2008. Analysis of the effects of ultrafine particulate matter while accounting for human exposure. *Environmetrics*. Apr 24;20(2):131-146.
103. RIVM, 2001. Report 711701 025. Re-evaluation of human-toxicological maximum permissible risk levels. Baars AJ, *et al.*, Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu. Bilthoven, the Netherlands, March 2001.
104. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V, 2000. *Le basi patologiche delle malattie*. Trad it, Padova, 6a edizione a cura di Cotran R *et al.*; 14-16.

105. Ross DT, Scherf U, Eisen MB, Perou CM, Rees C, Spellman P, Iyer V, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Waltham M, Pergamenschikov A, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Myers TG, Weinstein JN, Botstein D, Brown PO, 2000. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature genetics*; 24(3):227-35.
106. Russell WMS and Burch RL, 1959. *The principle of human experimental technique*. London: Meuthen, University Federation for Animal Welfare, Special Edition, 1992.
107. Sacks JD, Stanek LW, Luben TJ, Johns DO, Buckley BJ, Brown JS, Ross M, 2011. Particulate matter-induced health effects: who is susceptible? *Environ Health Perspect*; 119(4):446-54.
108. Sakai A, 2007. BALB/c 3T3 cell transformation assay for the assessment of chemical carcinogenicity. *Alternatives to Animal Testing and Experimentation*; 14,367-373.
109. Sakai A, Sasaki K, Muramatsu D, Arai S, Endou N, Kuroda S, Hayashi K, Lim YM, Yamazaki S, Umeda M, Tanaka N, 2010. A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. *Mutat Res*; Sep 30;702(1):100-22.
110. Sartorelli P, Ahlers HW, Cherrie JW, *et al.*, 2010. The 2008 ICOH Workshop on Skin Notation. *Med Lav*; 101(1):3-8.
111. Schauer JJ, Rogge WF, Hildemann LM, Mazurek MA, Cass GR, Simoneit BRT, 1996. Source apportionment of airborne particulate matter using organic compounds as tracers. *Atmospheric Environment*; 30(22):3837-3855.

- 112.** Schedin P, Elias A, 2004. Multistep tumorigenesis and the microenvironment. *Breast Cancer Res*; 6:93-101.
- 113.** Schikowski T, Sugiri D, Ranft U, Gehring U, Heinrich J, Wichmann HE, Krämer U, 2005. Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women. *Respir Res*; 22;6:152.
- 114.** Seinfeld JH and Pandis SN, 2006. *Atmospheric Chemistry and Physics: From Air Pollution to Climate Change*, J. Wiley and Sons, Inc., 2nd edition.
- 115.** Sen B, Mahadevan B, DeMarini DM, 2007. Transcriptional responses to complex mixtures-A review. *Mutat Res*; 636:144-177.
- 116.** Sevastyanova O, Binkova B, Topinka J, Srama RJ, Kalina I, Popov T, Novakova Z, Farmer PB, 2007. *In vitro* genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles. Part II: Human cell lines. *Mutation Research*; 620,123-134.
- 117.** Sharma AK, Jensen KA, Rank J, White PA, Lundstedt S, Gagne R, Jacobsen NR, Kristiansen J, Vogel U, Wallin H, 2007. Genotoxicity, inflammation and physico-chemical properties of fine particle samples from an incineration energy plant and urban air. *Mutation Research*; 633:95-111.
- 118.** Shi XC, Keane MJ, Ong T, Li SQ, Bugarski AB, 2010. Mutagenicity of diesel exhaust particles from an engine with differing exhaust after treatments. *J Toxicol Environ Health A*; 73(19):1314-24.
- 119.** Sjö Dahl K, Jansson C, Bergdahl IA, Adami J, Boffetta P, Lagergren J, 2007. Airborne exposures and risk of gastric cancer: a prospective cohort study. *Int J Cancer*; 120(9):2013-8.

- 120.** Sokolik IN, Toon OB, 1996: Direct radiative forcing by anthropogenic airborne mineral aerosol. *Nature*; 381;681-683.
- 121.** Steenhof M, Gosens I, Strak M, Godri KJ, Hoek G, Cassee FR, Mudway IS, Kelly FJ, Harrison RM, Lebret E, Brunekreef B, Janssen NA, Pieters RH, 2011. *In vitro* toxicity of particulate matter (PM) collected at different sites in the Netherlands is associated with PM composition, size fraction and oxidative potential--the RAPTES project. *Part Fibre Toxicol*; 2;8:26.
- 122.** Tanaka N, Bohnenberger S, Kunkelmann T, Munaro B, Ponti J, Poth A, Sabbioni E, Sakai A, Salovaara S, Sasaki K, Thomas BC, Umeda M. Prevalidation study of the BALB/c 3T3 cell transformation assay for assessment of carcinogenic potential of chemicals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Available online 17 December 2011, ISSN 1383-5718, 10.1016/j.mrgentox.2011.12.008. (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571811003615>)
- 123.** Tsao AS, Kim ES, Hong WK, 2004. Chemoprevention of cancer. *CA Cancer J Clin*; 54:150-180.
- 124.** Turner MC, Krewski D, Pope Iii CA, Chen Y, Gapstur SM, Thun MJ, 2011. Long-Term Ambient Fine Particulate Matter Air Pollution and Lung Cancer in a Large Cohort of Never Smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. Oct 6. [Epub ahead of print].
- 125.** U.S. EPA, 2005. Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. EPA/630/P-03/001B, March 2005. U.S. EPA, Washington, D.C.

- 126.** U.S. EPA, 2009. Integrated Science Assessment for Particulate Matter. EPA/600/R-08/139F. Research Triangle Park, NC: U.S. EPA.
- 127.** Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T, 2008. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* Oct-Dec;26(4):339-62.
- 128.** Van den Berg M, Birnbaum LS, Denison M, De Vito M, Farland W, Feeley M, Fiedler H, Hakansson H, Hanberg A, Haws L, Rose M, Safe S, Schrenk D, Tohyama C, Tritscher A, Tuomisto J, Tysklind M, Walker N, Peterson RE, 2006. The 2005 World Health Organization reevaluation of human and Mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds. *Toxicol Sci*; 93(2):223-41.
- 129.** Van Rooij JGM, Van Lieshout EMA, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ, 1993. Effect of the reduction of skin contamination on the internal dose of creosote workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Scand J Work Environ Health*; 19:200-207.
- 130.** Verheyen GR, Nuijten JM, Van Hummelen P, Schoeters GR, 2004. Microarray analysis of the effect of diesel exhaust particles on *in vitro* cultured macrophages. *Toxicol In Vitro*; 18 377-391.
- 131.** Vinikoor-Imler LC, Davis JA, Luben TJ, 2011. An ecologic analysis of county-level PM<sub>2.5</sub> concentrations and lung cancer incidence and mortality. *Int J Environ Res Public Health*; 8(6):1865-71.

- 132.** Waste incineration and Public health. Committee on Health effects of waste incineration, Board on environmental studies and toxicology. National Research Council 2000. pp. 1-364. U.S. National Academies Press. <http://www.nap.edu/catalog/5803.html>
- 133.** Weinmayr G, Romeo E, De Sario M, Weiland SK, Forastiere F, 2010. Short-term effects of PM<sub>10</sub> and NO<sup>2</sup> on respiratory health among children with asthma or asthma-like symptoms: a systematic review and meta-analysis. *Environ Health Perspect*; 118(4):449-57.
- 134.** WHO (World Health Organization) Regional Office for Europe, Copenhagen 2000. Air quality guidelines for Europe. II edition. WHO Regional Publications, European Series, No. 91.
- 135.** WHO (World Health Organization) Europe 2005. Effects of air pollution on children's health and development. A review of the evidence. Special programme on health and environment. European Centre for Environment and Health. Bonn Office.
- 136.** WHO (World Health Organization) Europe 2006. Health risks of particulate matter from long range transboundary air pollution. Joint WHO/Convention Task Force on the Health Aspects of Air Pollution. European Centre for Environment and Health, Bonn Office.
- 137.** Willis RA, 1952. The spread of Tumors in the Human Body. London, Butterworth & Co.
- 138.** Wong O, Harris F, Armstrong TW, Hua F, 2010. A hospital-based case-control study of acute myeloid leukemia in Shanghai: Analysis of environmental and occupational risk factors by WHO subtypes. *Chem Biol Interact*; 184:112-128.

- 139.** Yu O, Sheppard L, Lumley T, Koenig JQ, Shapiro GG, 2000. Effects of ambient air pollution on symptoms of asthma in Seattle-Area children enrolled in the CAMP study. *Environ Health Perspect*; 108:1209-1214.
- 140.** Zhao X, Wan Z, Zhuc H, Chenc R, 2003. The carcinogenic potential of extractable organic matter from urban airborne particles in Shanghai, China. *Mutation Research*; 540,107-117.

**Pubblicazioni, abstract e partecipazioni a congressi  
della Dott.ssa Angela Guerrini**

**Pubblicazioni su riviste scientifiche internazionali**

- Colacci A, Mascolo MG, Perdichizzi S, Quercioli D, Gazzilli A, Rotondo F, Morandi E, **Guerrini A**, Silingardi P, Grilli S, Vaccari M, 2011. Different sensitivity of BALB/c 3T3 cell clones in the response to carcinogens. *Toxicol In Vitro*. 2011 Sep; 25(6):1183-90.
- Mascolo MG, Perdichizzi S, Rotondo F, Morandi E, **Guerrini A**, Silingardi P, Vaccari M, Grilli S, Colacci A, 2010. BALB/c 3T3 transformation assay for the prediction of carcinogenic potential of chemicals and environmental mixtures. *Toxicol In Vitro*. 2010 Jun; 24(4):1292-300.

**Presentazioni di Abstract a Congressi**

- Colacci A, Mascolo MG, Perdichizzi S, Rotondo F, Morandi E, **Guerrini A**, Gazzilli A, Silingardi P, Grilli S e Vaccari M. The BALB/c 3T3 cell transformation assay to assess the carcinogenic activity of chemicals. ALTEX, 16th International Congress on *in vitro* Toxicology ESTIV 2010, Linz, Abstracts 27<sup>th</sup> Volume, Supplement ISSN 1868-596X 2010, p. 28.
- Vaccari M, Mascolo MG, Rotondo F, Silingardi P, Morandi E, Perdichizzi S, **Guerrini A**, Grilli S e Colacci A. The *in vitro* BALB/c 3T3 cell transformation assay to screen the anti-transforming activity of chemical compounds. ALTEX, 16th International Congress on *in vitro* Toxicology ESTIV 2010, Linz, Abstracts 27<sup>th</sup> Volume, Supplement ISSN 1868-596X 2010, p. 139.



- Silingardi P, Morandi E, Mascolo MG, Perdichizzi S, Rotondo F, **Guerrini A**, Vaccari M e Colacci A. Possibili effetti di interferenza endocrina del penconazolo: analisi trascrizionale nel modello T47D. 8° Convegno Nazionale Fitofarmaci e Ambiente. Roma May 2010.
- Vaccari M, Mascolo MG, Rotondo F, Silingardi P, Morandi E, Perdichizzi S, **Guerrini A**, Grilli S e Colacci A. The *in vitro* BALB/c 3T3 cell transformation assay to profile the carcinogenic activity of environmental mixtures. Abstracts 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences. Alternatives to Animal Experimentation ALTEX 26, Special Issue, Rome 2009, p. 106. ISSN 1868-596X.
- Silingardi P, Morandi E, Perdichizzi S, Vaccari M, Mascolo MG, Rotondo F, **Guerrini A**, Grilli S e Colacci A. Gene expression profiles as endpoints in hazard identification of environmental exposure. Abstracts 7<sup>th</sup> World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences. Alternatives to Animal Experimentation ALTEX 26, Special Issue, Rome 2009, p. 75. ISSN 1868-596X.

### **Partecipazione a Congressi/Convegni**

- *Rischio e beneficio degli alimenti: la ricerca di un equilibrio.* Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell'Emilia-Romagna (ARPA). Bologna, March 2010.
- *La valutazione e la stima del rischio tossicologico da esposizioni ambientali: metodologie sperimentali ed approcci integrati.* Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell'Emilia-Romagna (ARPA). June 2009.
- *Composti ad attività ormonale nell'ambiente e negli alimenti: Quali rischi?* Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell'Emilia-Romagna (ARPA). February 2009.