

ARTICOLO ORIGINALE

VALUTAZIONE DEI RISCHI ESPOSITIVI A CONTAMINANTI GENOTOSSICI

RISK ASSESSMENT OF EXPOSURE TO GENOTOXIC CONTAMINANTS

VINCENZA GIANFREDI¹, SAMUELE VANNINI², DANIELE NUCCI³, MILENA VILLARINI², MASSIMO MORETTI²

¹*Scuola di Specializzazione in Igiene e Medicina Preventiva,
Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Perugia;*

²*Dipartimento di Scienze Farmaceutiche (Unità di Sanità Pubblica), Perugia;*

³*Unità di Endoscopia Digestiva, Istituto Oncologico Veneto IOV-IRCC, Padova*

Riassunto

Quotidianamente siamo esposti ad un elevato numero di sostanze esogene, presenti in tutte le matrici che ci circondano (suolo, acqua aria), alcune delle quali possono rappresentare un pericolo per la salute. L'analisi del rischio è l'insieme di processi necessari all'identificazione di un pericolo, e attraverso il quale è possibile ottenere informazioni riguardanti gli xenobiotici a cui la popolazione è esposta. L'aspetto qualitativo dell'analisi del rischio, rappresentato dalla valutazione del rischio, serve a determinare quali tipologie di effetti avversi un determinato xenobiotico possa produrre, i meccanismi con cui è in grado di colpire determinati tessuti ed organi e di quali malattie potrebbe aumentare l'incidenza. Tutte le informazioni necessarie sono ottenute attraverso studi in vitro, studi in vivo su animali da laboratorio e studi epidemiologici direttamente sull'uomo. Una delle maggiori difficoltà in queste indagini è rappresentata proprio dal disegno dello studio in quanto deve essere realizzato tenendo conto di molteplici aspetti come ad esempio le caratteristiche chimico-fisiche dello xenobiotico, la matrice ambientale in cui è possibile ritrovare lo stesso e il parametro biologico che si vuole analizzare. Lo scopo di questa revisione è quello di entrare nel dettaglio della valutazione del rischio, elencando a titolo esemplificativo i test più utilizzati nell'analisi del rischio su matrici a cui una popolazione risulta essere continuamente esposta, cioè aria, acqua e suolo.

Parole chiave: Rischio genotossico, test in vitro, matrici ambientali, biomarcatori.

Abstract

Risk assessment of exposure to genotoxic contaminants

Every day we are exposed to a large number of exogenous substances, present in all matrices that surround us (soil, water, air), some of which may pose a health hazard. The risk analysis is the set of processes needed to identify health risks, and through which we can get information about the people's xenobiotics exposition. The qualitative aspect of the risk analysis, represented by the risk assessment, is aimed to determine which types of adverse effects a given xenobiotic can produce; the mechanisms by which it is able to hit certain tissues and organs; and which diseases it could be associated. All necessary information are obtained through in vitro studies; in vivo studies, a laboratory evaluation on animals; and epidemiological studies, directly in humans. The main difficulty in these investigations is represented by the precise design of the study since it must take in account multiple aspects such as, chemical-physical characteristics of the xenobiotic, the environmental matrix in which it is possible to find, and the biological parameter object of the analysis. The purpose of this review is to go into the details of the risk assessment, listing as an example the most widely used tests in the risk assessment of matrices to which a population is being constantly exposed, i.e. air, water and soil.

Key words: Genotoxic risk, in vitro test, environmental matrices, biomarkers.

Introduzione

Gli xenobiotici sono le sostanze estranee all'organismo responsabili anche di effetti biologici indesiderati. La loro attività biologica è determinata in gran parte dalle loro proprietà intrinseche, ma è condizionata anche dalla risposta dell'organismo stesso. Gli xenobiotici possono entrare a contatto con l'organismo per ingestione, inalazione, contatto diretto o iniezione.

Indipendentemente dalla modalità di somministrazione, e una volta entrati nel circolo sanguigno, i composti esogeni si distribuiscono ai vari distretti corporei. La distribuzione, però, non è uniforme, ma piuttosto è noto un particolare tropismo verso alcuni organi "bersaglio"; dando luogo a fenomeni di bioaccumulo⁽²⁷⁾.

Il metabolismo degli xenobiotici è schematicamente suddivisibile in due fasi principali: fase 1 o di attivazione (tramite reazioni di ossidazione, riduzione o idrolisi) e fase 2 o di coniugazione, che sono necessarie a rendere queste molecole più facilmente eliminabili dall'organismo, convertendo substrati poco idrosolubili in forme molecolari più polari.

Il metabolismo degli xenobiotici rappresenta dunque, un sistema di difesa centrale rispetto alla potenziale azione tossica delle sostanze chimiche. Tuttavia qualche intermedio metabolico può risultare più instabile e, di conseguenza, più reattivo del composto di origine.

Gli effetti tossici degli xenobiotici possono essere definiti acuti o cronici, in funzione della durata e dell'intensità dell'esposizione alla quale il soggetto è sottoposto. Possono essere effetti reversibili o irreversibili e possono evolvere in modificazioni fisiologiche e o patologiche dell'organo bersaglio a breve o lungo termine⁽⁴⁴⁾. Oppure possono essere classificati in base al tipo di danno che questi vanno a determinare a livello del DNA.

Possono verificarsi cambiamenti nel contenuto o nella disposizione dell'informazione genetica in base all'interazione tra composto esogeno, DNA e meccanismi riparatori delle cellule. Gli eventuali danni al DNA che ne derivano, possono coinvolgere un solo nucleotide della sequenza del DNA o nella struttura o interi cromosomi. A seconda quindi dell'entità del danno possiamo distinguere mutazioni di tre tipi: genetiche, cromosomiche (strutturali e/o numeriche) e genomiche⁽²⁷⁾.

Le mutazioni possono essere distinte in spontanee o indotte (causate da agenti mutageni). Le mutazioni spontanee sono quelle che avvengono in assenza di specifici agenti esterni identifi-

cabili e si verificano con una frequenza che va da 10^{-4} a 10^{-9} ⁽¹⁶⁾.

Le mutazioni spontanee sono alla base del fenomeno della cancerogenicità, e rappresentano il prezzo da pagare per il fenomeno dell'adattamento e dell'evoluzione⁽²²⁾. Le mutazioni spontanee probabilmente sono anche implicate nel processo di invecchiamento, nelle malattie autoimmuni, nella neurodegenerazione e nell'aterosclerosi e sono la risultante di fattori esogeni che possono essere sia mutageni che antimutageni. Le mutazioni, sia spontanee che indotte, possono avvenire in qualsiasi porzione del genoma, seppur con maggior frequenza in quelli che sono stati definiti da Benzer come hot spot, cioè regioni del DNA dove più facilmente si accumulano mutazioni⁽⁹⁾.

La risposta dell'organismo all'esposizione agli agenti esogeni può variare in funzione del sesso, dell'età e dello stato di salute. Infatti sono state riscontrate delle notevoli differenze tra i due sessi, che dipendono direttamente o indirettamente dall'azione degli ormoni.

I sistemi metabolici cambiano anche in relazione a diverse condizioni fisiologiche e possono essere alterati da particolari patologie, soprattutto quelle che incidono sulla funzionalità epatica e renale. Anche diversi fattori ambientali e comportamentali come la dieta il clima l'uso di alcol e tabacco, l'assunzione di farmaci, lo stress, l'attività fisica, la denutrizione e l'obesità influenzano l'attività metabolica.

La variabilità della capacità metabolica può avere dei notevoli riflessi sulla suscettibilità individuale agli effetti tossici che derivano dall'esposizione agli xenobiotici⁽³³⁾.

Biomarcatori

I biomarcatori sono specifici parametri di misura che permettono di quantificare e valutare le conseguenze derivanti dall'esposizione dell'organismo umano agli xenobiotici. L'approccio di epidemiologia molecolare, tramite metodiche di monitoraggio biologico e di monitoraggio di effetto biologico, consente una analisi approfondita dell'esposizione umana a sostanze genotossiche e può fornire un valido contributo per valutare i rischi mutageno/cancerogeni conseguenti all'esposizione⁽³⁷⁾.

Il biomonitoraggio è un metodo estremamente utile per stimare il rischio genetico derivante dall'esposizione a miscele complesse di xenobiotici, che mediante l'utilizzo di biomarcatori è in grado di valutare le risposte genotossiche riparabili e/o permanenti ed i fattori di

suscettibilità individuale ^(41, 10). Il monitoraggio biologico presenta inoltre il vantaggio, rispetto a quello ambientale, di valutare l'esposizione globale dell'individuo in funzione della maggiore o minore suscettibilità dello stesso, o in relazione alla presenza di fattori endogeni che possono influenzare la cinetica metabolica della sostanza.

Il monitoraggio biologico mediante la determinazione di specifici biomarcatori è in grado di fornire una stima integrata dell'esposizione e dell'assorbimento degli agenti genotossici. Per "biomarcatore" si intende un evento (biochimico, molecolare o genetico), misurabile in un sistema biologico ⁽¹³⁾, che possa essere considerato nel continuum tra un evento iniziale (es. esposizione a xenobiotico) ed il risultante stato patologico (es. neoplasia).

I biomarcatori possono essere rilevati in diversi tessuti, organi e/o fluidi biologici. Il sangue e l'urina rappresentano dei medium di grande interesse, sia perché facilmente disponibili, sia perché il primo occupa una posizione centrale nella distribuzione di agenti esogeni ad organi e tessuti, il secondo contiene molti composti che vengono escreti come prodotti finali di processi metabolici.

Usualmente vengono identificati quattro principali tipi di biomarcatori ^(32, 43):

- biomarcatori di esposizione (forniscono indicazioni riguardo la presenza ed, eventualmente, i livelli dell'esposizione a composti xenobiotici);
- biomarcatori di dose biologica efficace (forniscono indicazioni riguardo l'entità della interazione dello xenobiotico assorbito con le macromolecole coinvolte nel processo della cancerogenesi);
- biomarcatori di effetto biologico precoce (sono rappresentati da alterazioni irreversibili, funzionali o strutturali a carico del genoma.);

- biomarcatori di suscettibilità genetica individuale (forniscono indicazioni riguardo eventuali elevate sensibilità di singoli soggetti agli effetti degli xenobiotici).

Questa classificazione però non è così rigida e frequentemente si possono osservare delle sovrapposizioni delle quattro classe ⁽²¹⁾. Ad ogni modo, sulla base di questa classificazione potrebbe essere possibile individuare un indicatore biologico (biomarcatore) in ogni tappa del percorso di un composto genotossico all'interno dell'organismo, a partire dal suo assorbimento, fino ad arrivare all'attacco nucleofilo al DNA ed alla eventuale fissazione del danno, fino alla sua escrezione (Figura 1).

Dallo schema risulta evidente come gli endpoint misurati dai biomarcatori di esposizione (risposte genotossiche transitorie/reversibili) siano distinti da quelli di effetto (risposte genotossiche irreversibili).

Un biomarcatore in ogni caso, per essere considerato tale, deve fornire, circa l'esposizione monitorata, risultati quantitativi, deve essere sensibile anche a basse dosi di esposizione, deve essere il più possibile specifico e non deve richiedere indagini invasive.

Biomarcatori di esposizione

Sono una categoria di biomarcatori che indicano l'esposizione ad un agente mutageno, ma non necessariamente un suo effetto sull'organismo. Tra i biomarcatori di esposizione ci sono, ad esempio, i "biomarcatori di dose interna" che consentono di stimare l'entità dell'esposizione ad un dato composto chimico o ad una miscela di composti ad attività genotossica, misurando la concentrazione dello stesso e/o dei suoi metaboliti nei fluidi biologici ^(38-40, 46, 47)

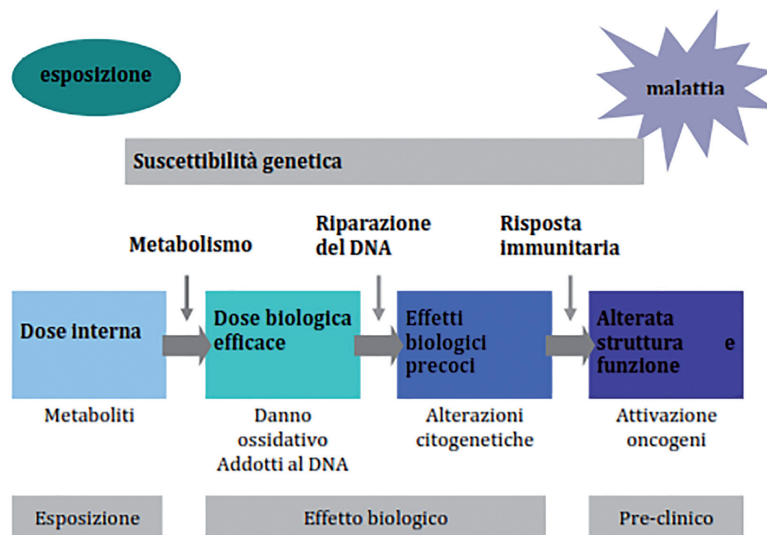


Figura 1. Schema dei biomarcatori utilizzati negli studi di epidemiologia molecolare.
 Figure 1. Biomarkers pattern used in molecular epidemiology studies

oppure valutando l'attività mutagena urinaria (es. utilizzando il Salmonella/microsomi test)⁽¹⁷⁾ o ancora dosando i tiosteri urinari⁽²⁹⁾. Anche alterazioni di vie metaboliche implicate nella biotrasformazione degli xenobiotici, come ad esempio una aumentata attività di enzimi di fase I, possono essere valutate (es. determinando l'escrezione urinaria di acido D-glucarico)⁽²⁹⁾ e dare indicazioni riguardo avvenute esposizioni a sostanze potenzialmente dannose.

Biomarcatori di effetto biologico

Indicano gli effetti dell'agente mutageno sull'organismo e sono suddivisi in: (1) biomarcatori di dose biologica efficace, (2) biomarcatori di effetto biologico precoce. I "biomarcatori di dose biologica" efficace consentono una valutazione a livello cellulare o tissutale dell'entità delle alterazioni reversibili causate dall'esposizione agli xenobiotici⁽²⁰⁾ (es. misurando i livelli di danno primario al DNA, di addotti al DNA o di addotti alle proteine).

I "biomarcatori di effetto biologico precoce" permettono di evidenziare gli effetti biologici irreversibili che si sviluppano in seguito all'esposizione alle sostanze esogene. I biomarcatori di effetto biologico precoce permettono la valutazione, tramite analisi citogenetiche, di alterazioni a livello del genoma quali una aumentata frequenza di aberrazioni cromosomiche (AC) numeriche e strutturali, di scambi fra cromatidi fratelli (SCE, sister-chromatid exchanges) e di micronuclei (MN), fornendo, quindi, una misura delle alterazioni di alcuni bersagli genetici rilevanti. In alcuni casi, possono essere considerati anche indicatori di anomalie precliniche o comunque dotati di caratteristiche di predittività⁽⁴⁸⁾.

Diversi studi effettuati sia *in vivo* che *in vitro* hanno dimostrato come le radiazioni ionizzanti e non ionizzanti e molti agenti chimici siano in grado di generare alterazioni a livello cromosomico⁽⁴⁵⁾. Tali osservazioni, unite alla forte correlazione riscontrata tra specifiche alterazioni citogenetiche e cancerogenesi⁽²⁸⁾, rendono evidente il ruolo del monitoraggio citogenetico nella determinazione dei rischi per la salute correlati a numerose esposizioni, professionali o semplicemente legate allo stile di vita. Sin dai primi studi di monitoraggio citogenetico, elevati livelli di aberrazioni cromosomiche sono stati associati all'esposizione professionale ad agenti chimici genotossici quali il benzene, il cloruro di vinile, l'ossido di etilene, il butadiene e diversi agenti alchilanti⁽²⁾.

In particolare un aumento di AC può essere considerato come indicativo di aumentato ri-

schio di tumori a livello di popolazione ma non a livello individuale⁽²⁶⁾. La misurazione di tali biomarcatori, inoltre, può fornire importanti informazioni per la ricostruzione di passate esposizioni con conseguenti effetti cumulativi.

Biomarcatori di suscettibilità genetica individuale

Sono rappresentati da mutazioni o polimorfismi a carico di geni che regolano molti processi chiave relativi alla cancerogenesi nell'uomo, come ad esempio: (1) geni che regolano il metabolismo delle sostanze mutagene, ovvero, in grado di attivare la degradazione degli xenobiotici, (2) geni che controllano i meccanismi di riparazione del DNA, anche questi, a seconda della loro efficacia, modificano la sensibilità agli xenobiotici, (3) geni di immunocompetenza che determinano la capacità dell'organismo di reagire alle malattie causate da mutazioni genetiche; (4) geni che regolano il ciclo cellulare e l'apoptosi.

Recenti indagini hanno evidenziato che molti geni codificanti per attività enzimatiche coinvolte nell'attivazione (enzimi di Fase I) o detossificazione (enzimi di fase II) di xenobiotici cancerogeni risultano, nell'uomo, polimorfici. Pertanto, una loro diversa espressione potrebbe essere in grado di modulare la suscettibilità dei singoli soggetti all'azione degli xenobiotici. Di conseguenza, lo stesso livello espositivo a composti genotossici potrebbe non risultare correlato, nei diversi soggetti, con lo stesso grado di rischio⁽³¹⁾.

Test *in vitro*

Per diversi anni si sono applicati unicamente test batterici, come il *test di Ames*, per la valutazione della potenzialità mutagena di numerose sostanze⁽¹⁾. Il test di Ames prevede l'utilizzo del batterio *Salmonella typhimurium* e si basa sulla valutazione di diversi endpoint genetici, come mutazioni puntiformi dovute a sostituzioni di coppie di basi o a delezioni/inserzioni di basi sul DNA delle colonie batteriche, determinate proprio dalla esposizione a sostanze tossiche.

Il test prevede l'utilizzo di almeno tre concentrazioni della sostanza che si intende saggiare. Queste verranno incorporate su terreni di coltura. I ceppi batterici utilizzati, presentano una mutazione genica che rende i batteri dipendenti dal terreno di coltura⁽⁸⁾. In altre parole, i batteri riescono a sopravvivere solo se il terreno, nel quale vengono messi in coltura, dispone di biotina.

L'esperimento si basa sulle capacità genotossiche stocastiche del composto che si vuole analizzare, il quale, in maniera casuale appunto, andrà a determinare delle mutazioni puntiformi sul filamento di DNA, tali da ripristinare la capacità del batterio di sintetizzare biotina. Questo permetterà dunque al batterio di crescere anche in terreni privi di biotina.

Questo tipo di approccio sperimentale non può però essere applicato efficacemente su cellule di mammifero le quali essendo diploidi non permettono di visualizzare immediatamente in termini fenotipici l'effetto determinato dall'esposizione a sostanze genotossiche. È dunque possibile eseguire questo tipo di test solo con un numero limitato di geni bersaglio come ad esempio il test HPRT, il test Na⁺/k⁺ ATPasi, o il test del linfoma di topo.

Tutti test che, seppur con metodiche differenti, si basano sulla perdita della funzione enzimatica dovuta a sostituzione di base, mutazioni frameshift o piccole delezioni⁽³⁴⁾. Tuttavia il vantaggio di lavorare con cellule di mammifero risiede nella possibilità di compiere analisi fini sulle rotture e gli arrangiamenti indotti da agenti clastogeni sul materiale genetico come aberrazioni strutturali, numeriche, o MN, oltre a quantificare il possibile danno da esposizione professionale o ambientale. Per l'esecuzione di questi test la divisione cellulare è essenziale per l'espressione del danno cromosomico e il tipo di danno è funzione della fase del ciclo cellulare in cui era la cellula al momento del trattamento o l'esposizione.

L'analisi citogenetica è un metodo molto accurato e affidabile, condotto mediante microscopia ottica. In base alla fase del ciclo cellulare è possibile identificare tipologie diverse di danno al DNA. L'analisi in metafase permette l'osservazione di *aberrazioni cromosomiche strutturali, numeriche e di scambi tra cromatidi fratelli*.

Tuttavia lo studio delle aberrazioni cromosomiche è un approccio molto specifico, che data la sua complessità, la necessità di valutare un alto numero di cellule e la possibilità di artefatti tecnici, soprattutto a dovuti alla perdita di cromosomi, ha stimolato lo sviluppo di tecniche più veloci per la misura del danno cromosomico, come l'analisi in interfase.

L'analisi in interfase permette l'esecuzione del test del micronucleo oltre all'ibridazione in situ fluorescente (FISH). Considerando che le sostanze genotossiche possono causare rotture nella catena del DNA, conseguenti ad azione diretta, intercalazione o interazione con enzimi (es. endonucleasi), i danni derivanti da tali rotture possono essere rilevati mediante il test della

cometa o Comet test indipendentemente dalla fase del ciclo cellulare.

Il test del micronucleo per la valutazione del danno cromosomico venne proposto nel 1976 da Countryman e Heddle come alternativa più rapida meno soggettiva e meno costosa rispetto alle analisi in metafase⁽¹⁵⁾. Infatti contrariamente a quest'ultime, il test del micronucleo richiede tempi di lettura molto più brevi, minore esperienza del personale e l'utilizzo di cellule in interfase, che risultano più facilmente analizzabili in elevato numero e in breve tempo.

I vantaggi del test del micronucleo hanno fatto sì che via via andasse a sostituire i classici test in metafase. Inoltre il micronucleo può essere eseguito sia in linfociti umani che cellule esfoliate della mucosa buccale⁽¹¹⁾. I MN non sono altro che piccoli nuclei accessori morfologicamente simili al nucleo principale della cellula ma con dimensioni che vanno da 1/3 a 1/8 di quest'ultimo.

I MN neoformati possono contenere di cromosomi interi o frammenti di essi, che non sono stati correttamente segregati durante la divisione cellulare (Figura 2).

Per tale ragione i MN possono essere considerati indicatori diretti sia di rotture a livello cromosomico sia di alterazioni dell'apparato del fuso mitotico.

Per quanto riguarda il test di ibridazione in situ o FISH, questo si basa sul principio per cui qualunque sequenza di DNA è capace di legarsi ad una sequenza complementare, per cui utilizzando sequenze specifiche marcate con sonde fluorescenti, è possibile evidenziare specifici geni. Tuttavia l'utilizzo di materiale radioattivo risulta essere pericoloso per l'operatore, inoltre esiste un limite intrinseco al test per cui risulta difficile localizzare esattamente i segnali di ibridazione. Per questo motivo il test del MN risulta al momento quello più adoperato⁽³⁴⁾. Tuttavia il test FISH può essere accoppiato al test del micronucleo al fine di analizzare le caratteristiche del materiale genetico che costituisce il micronucleo neoformato.

Nel test della cometa invece, originariamente proposto da Östling & Johanson (1984)⁽³⁰⁾ e successivamente modificato da Singh et al., 1988,⁽³⁵⁾ le cellule sospese in agarosio vengono stratificate su vetrino e lisate con detergenti e soluzioni saline. Le cellule vengono poi poste in condizioni neutre o alcaline, e il DNA viene fatto correre in un campo elettroforetico.

Questo trattamento va a lisare quelle che sono le strutture più labili della cellula come le proteine o le membrane cellulari senza però, andare ad intaccare il DNA che risulta essere

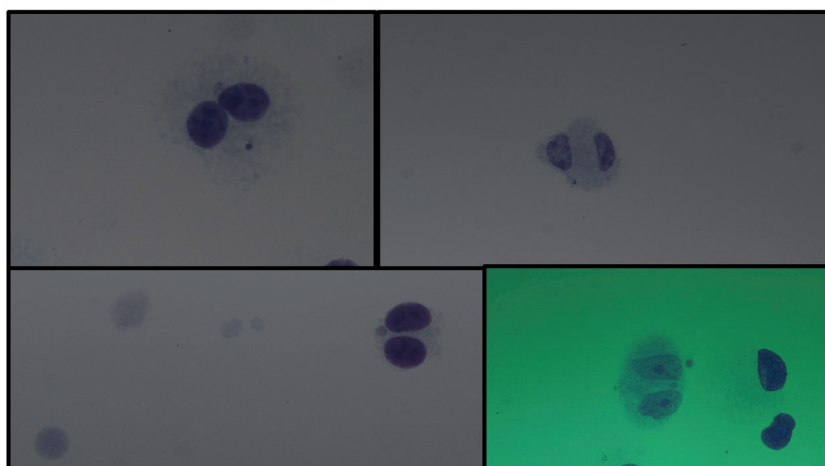


Figura 2. Esempi di micronuclei
 Figura 2. Examples of Micronuclei

una molecola particolarmente stabile grazie alla presenza del desossiribosio.

I vetrini così ottenuti, dopo colorazione, vengono osservati al microscopio a fluorescenza⁽³⁰⁾. In assenza di danno, il nucleo risulta compatto e tondeggiante. Nel caso in cui vi siano rotture al DNA, i frammenti, carichi negativamente per la presenza dei gruppi fosfato, migrano verso l'anodo conferendo al materiale nucleare la morfologia di una cometa (da qui il nome del test) la cui lunghezza è direttamente proporzionale all'entità del danno⁽⁴²⁾ (Figura 3).

I vantaggi del comet test sono dovuti alla possibilità di utilizzare un numero estremamente basso (anche dell'ordine di centinaia) di qualsiasi tipo di cellula eucariotica (sia animale che vegetale), richiede tempi di esecuzione e di analisi relativamente brevi ed è molto sensibile, essendo in grado di evidenziare una rottura nel filamento di DNA ogni 10^{10} Dalton⁽³⁶⁾.

Con questo test possono essere determinate discontinuità nel DNA che interessino sia il singolo (SSB, *single strand breaks*) che il doppio (DSB, *double strand breaks*) filamento della molecola, siti aperti per azione dei sistemi enzimatici di riparo per escissione, nonché alterazioni quali i siti alcali-labili (siti apurinici/apirimidinici) che possono essere ricondotte, nelle condizioni alcaline sperimentali, a rotture dello scheletro fosfodiesterico della molecola.

Monitoraggio della genotossicità in matrici ambientali

Aria

L'inquinamento a carico dell'aria può derivare principalmente da fenomeni naturali come le polveri e i fumi emessi dalle eruzioni vulcaniche,

oppure essere derivato da attività umane, come i fumi derivanti da tutti i processi di combustione industriale, domestica (riscaldamento delle abitazioni) o autoveicolare. Inoltre, esiste un inquinamento indoor che è principalmente dovuto a colle, vernici o prodotti usati per l'igiene delle abitazioni⁽³⁾.

Studi epidemiologici hanno evidenziato come campioni di aria provenienti da aree urbane abbiano effetti genotossici maggiori rispetto a campioni prelevati in aree rurali^(4,5). Il campionamento delle particelle aeree viene eseguito per mezzo di un campionatore ad impatto a cascata ad alto volume che permette il campionamento di grandi volumi di aria in breve tempo.

Il principio di funzionamento di questi campionatori permette l'isolamento delle diverse frazioni di inquinanti presenti nell'aria. Infatti, il cammino delle particelle, aspirate da una pompa a flusso regolabile, inizia nell'area di frazionamento dove le particelle molto grossolane sono trattenute da uno strato di vasellina disposto sulla superficie di impatto.

Il flusso d'aria poi passa per una griglia di protezione per gli insetti e giunge alla zona filtri, dove sono posizionate le membrane in fibra di vetro. I filtri sono costituiti da lastre metalliche chiamati impattori impilate le une sopra le altre con delle fenditure parallele che diventano sempre più sottili scendendo verso il basso, sopra le quali sono disposte le membrane adsorbenti in fibra di vetro. Le particelle con dimensioni maggiori rispetto al taglio dell'impattore sono trattenute sul primo filtro dell'impattore stesso.

Il flusso d'aria quindi passa attraverso le fenditure sul filtro e le particelle accelerano verso il secondo impattore che trattiene quelle più grandi lasciando proseguire quelle più piccole con la medesima procedura e così via per i rimanenti strati d'impatto (Figura 4).

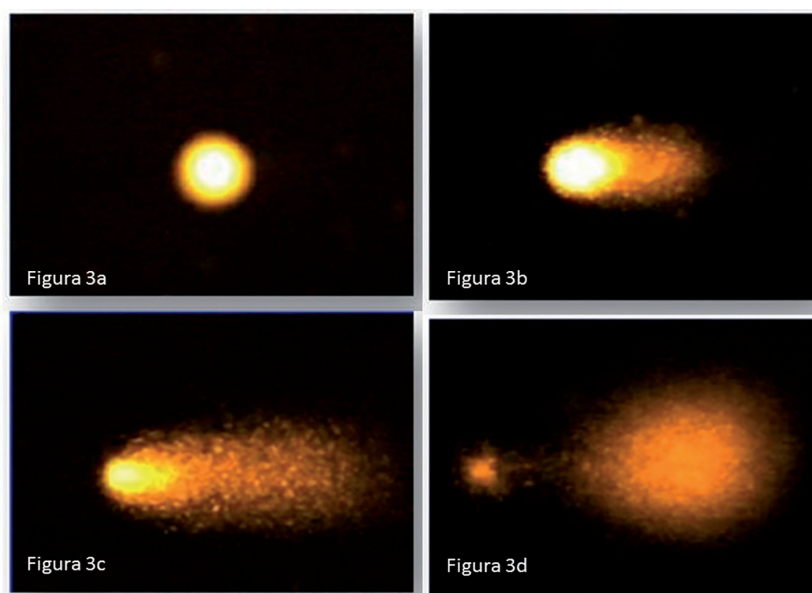


Figura 3. Progressiva espressione del danno al DNA mediante test della cometa.

Figura 3 a Nessun danno. Figura 3 b Danno moderato. Figura 3 c Danno intenso. Figura 3 d Cellula Hedgehog.

Figure 3. Progressive expression of DNA damage through comet test. Figure 3 a No damage. Figure 3 b Moderate damage. Figure 3 c High grade of damage. Figure 3d Hedgehog's cell.

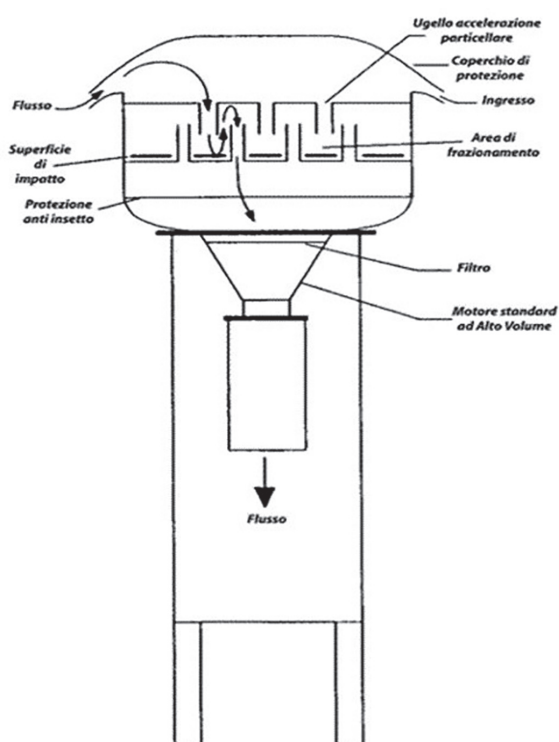


Figura 4. Campionatore ad alto volume per particolato. Matrice aria.

Figure 4. High volume sampler for particulate sampling. Air matrix.

Dopo l'ultimo strato di impatto, viene posizionata una membrana adsorbente di dimensioni maggiori che trattiene tutte le particelle con diametro inferiore agli $0.5\mu\text{m}$.

La necessità di studiare l'effetto genotossico determinato dagli inquinanti a varie dimensioni,

è strettamente legato al meccanismo fisiologico della respirazione. Infatti, le particelle più grosse inalate, rimangono intrappolate sulla mucosa delle prime vie respiratorie, che attraverso il meccanismo di clearance muco-ciliare le elimina agevolmente, senza che vi sia alcun danno per l'organismo.

Le particelle di dimensioni più piccole invece, riescono ad arrivare in profondità fino agli alveoli, e qui, attraversare la membrana alveolo-capillare ed essere conseguentemente assimilate nell'organismo umano. Una volta effettuato il campionamento, e dopo aver estratto dal filtro i composti inquinanti, si procede alla valutazione della mutagenicità. Il test maggiormente usato è il test di Ames, i cui risultati esprimono la potenza mutagenica specifica, cioè il numero di mutageni per unità di peso estratto.

Un recente studio epidemiologico, che invece ha permesso di valutare gli effetti biologici dell'inquinamento atmosferico sui bambini è lo studio MAPEC (*Monitoring Air Pollution Effects on Children to support public health policies*)⁽¹⁹⁾, nato dalla collaborazione tra 5 atenei italiani (Università di Brescia, Università di Torino, Università di Pisa, Università di Pisa, Università di Perugia, Università del Salento). Lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'associazione tra le misure di esposizione all'inquinamento atmosferico (inquinanti chimici e la tossicità PM e mutagenicità/genotossicità) e i biomarcatori di effetto biologico precoce con l'obiettivo di verificare l'applicabilità di tale metodo nella valutazione dei rischi genotossici legati all'inquinamento aereo.

Il parametro principale valutato è stato l'induzione di micronuclei nelle cellule della muco-

sa buccale di bambini in età scolare (6-8 anni) in relazione all'inquinamento atmosferico e altri fattori di rischio associati agli stili di vita dei bambini.

Il campionamento biologico è stato effettuato spazzolando le guance dei bambini e raccogliendo le cellule della mucosa buccale, su cui poi è stato effettuato il test del micronucleo. Parallelamente ai campionamenti biologici, sono state raccolte le polveri ultrafini nei pressi delle scuole, per l'analisi della matrice (aria) posizionando un campionatore ad alto volume per 72 ore durante i giorni di prelievo biologico, che sono state poi analizzate chimicamente e ne è stata testata la mutagenicità/genotossicità *in vitro*.

Acqua

Allo stato attuale anche le matrici idriche risultano essere globalmente inquinate, e la pericolosità di tale inquinamento non risiede solo nella possibile contaminazione batterica delle fonti idriche, ma anche dalla possibile presenza di agenti mutageni, cancerogeni e teratogeni. In riferimento a questo secondo tipo di contaminazione, il rischio risulta derivante da: acidi umici (sostanze naturali che si formano a seguito della biodegradazione di materia organica), interferenti endocrini, sottoprodotti della disinfezione (principalmente prodotti della clorazione), contaminanti naturali di origine idrogeologica⁽¹⁸⁾.

Tali tipi di contaminanti vengono individuati o attraverso dei campioni ambientali, o attraverso la valutazione di danni su organismi come pesci o piante acquatiche. Nello specifico, per quanto riguarda il cloro, i possibili danni deriverebbero dall'interazione tra il cloro attivo libero e i substrati organici disciolti⁽²³⁾.

La presenza invece, di idrocarburi nelle acque può essere conseguente a sversamenti accidentali di sottoprodotti del petrolio. Tali tipi di sostanze però, hanno una forte e comprovata azione genotossica nell'uomo, e per tale ragione il D.Lgs. 02-02-2001 n. 31 "Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano per il mantenimento del proprio bilancio idrico" indica precisi livelli soglia.

Tuttavia, la problematica legata ai prodotti della clorazione risiede nel fatto che seppur l'ente gestore dell'impianto di depurazione dell'acqua, certifica e gestisce le caratteristiche dell'acqua a monte della rete, molto più difficile risulta invece riuscire a monitorare le eventuali interazioni tra i derivati del cloro e le compo-

nenti organiche⁽¹²⁾. A seguito dell'interazione tra cloro e composti organici possono formarsi le cloroammine che sono risultate irritanti per la mucosa esterna, e si è dimostrato abbiano effetti teratogeni nel feto, in quanto non ha ancora sviluppato dei meccanismi di detossificazione⁽²⁴⁾. Gli interferenti endocrini derivano dall'utilizzo di pesticidi che, per percolazione possono contaminare una falda freatica, o derivano da clorofenoli, idrocarburi policiclici aromatici e ftalati. L'azione genotossica degli interferenti endocrini è stata dimostrata sia *in vitro* che *in vivo*. Hanno, infatti, la capacità di interagire con il DNA creando degli addotti, cioè si legano al DNA costituendo macromolecole⁽²⁵⁾.

Sebbene la capacità genotossica di tali inquinanti è nota, i dati sull'uomo non sono ancora definitivi e spesso contraddittori, tanto che gli Enti Regolatori hanno stabilito il Principio di massima Precauzione, secondo il quale in assenza di dati certi, è preferibile ridurre la potenziale esposizione in attesa di ulteriori conferme⁽¹⁴⁾. Gli effetti genotossici delle acque inquinate sono più facilmente riscontrabili in organismi minori, dotati di minori capacità detossificanti, e che potrebbero essere considerati come bio-indicatori.

Uno degli studi più importanti a tal proposito è quello pubblicato nel 1982 da Baumann⁽⁶⁾ il quale rilevò un'alta concentrazione di IPA (idrocarburi policiclici aromatici) nelle acque del fiume Black River in Ohio, che si associava a una incidenza aumentata di tumori nei pesci e allo stesso tempo si osservò che alla riduzione degli inquinanti si associava anche la contestuale riduzione delle neoplasie nei pesci⁽⁷⁾.

Suolo

A seguito dell'industrializzazione, molte delle attività umane come l'agricoltura, l'urbanizzazione e lo sviluppo industriale stesso hanno determinato un progressivo degrado e inquinamento del suolo. I contaminanti del suolo derivano principalmente dall'utilizzo di fertilizzanti o pesticidi (anche a scopo di Sanità Pubblica), emissioni industriali, traffico veicolare, impianti termici, gestione impropria di rifiuti pericolosi o anche abbandono di siti militari o industriali; provocando un inquinamento del suolo per spandimento, assorbimento, liscivazione o per assorbimento da parte delle piante.

Gli xenobiotici che maggiormente risultano presenti nel terreno comprendono composti organici (IPA, pesticidi) e inorganici (metalli pesanti). In riferimento agli inquinanti del suolo però, risulta essere di estrema importanza l'intervallo

di tempo compreso tra l'evento inquinante e il campionamento, e la concentrazione totale dell'inquinante rispetto al livello base. Infatti, l'inquinamento del suolo è generalmente determinato da una miscela di più sostanze, che possono reagire tra di loro, sviluppando un'azione tossica additiva.

Inoltre, l'azione tossica che un suolo inquinato può avere sulla salute dell'uomo, può avvenire mediante molteplici modalità: contaminazione di falde acquifere, inalazione di sostanze volatili, inconsapevole cambiamento di destinazione d'uso di ex suoli industriali, o arrivare all'uomo attraverso la rete alimentare (sia tramite vegetali, che il consumo di carne).

Il test di mutagenesi più frequentemente utilizzato per la valutazione a breve termine della genotossicità di un suolo è senza dubbio il test di Ames. Questo test, infatti, permette di valutare sia l'attività genotossica, che l'effetto indotto dalla mutazione.

Un importante studio Europeo ha analizzato la genotossicità, mediante il test di Ames, di diversi suoli tedeschi prelevati da siti altamente industrializzati, o con frequente traffico veicolare, che sono stati poi confrontati con suoli di aree remote della Corsica. Lo studio ha evidenziato come i campioni di suoli provenienti da aree a forte antropizzazione mostravano importanti effetti genotossici. Inoltre, è stato possibile anche verificare un cambiamento stagionale estate/inverno rispecchiando l'andamento del traffico veicolare.

Tuttavia, ai fini del monitoraggio ambientale, la genotossicità indotta in situ da inquinanti può essere valutata mediante l'utilizzo di organismi vegetali o animali. Il test del MN può, infatti, essere effettuato su talee o pianta intera di *Tradescantia* oppure, si può effettuare il comet test su cellule del verme *Eistenia fetida*.

Conclusioni

L'analisi del rischio è un processo finalizzato a studiare i casi in cui un organismo, un sistema o una popolazione possono essere esposti a un pericolo. Il processo comprende tre fasi che sono rappresentate dalla valutazione del rischio (*risk assessment*), finalizzata ad identificare i fattori di rischio, la loro natura e la probabilità che essi determinino un effetto avverso in specifiche circostanze; la gestione del rischio (*risk management*), la cui finalità è di controllare ed eventualmente di ridurre l'entità del rischio tenendo conto, oltre che delle indicazioni del *risk assessment*, di considerazioni economiche, tecniche,

etiche e sociali; infine la comunicazione del rischio (*risk communication*), in cui si informa la popolazione del reale rischio cui è esposta.

Una volta identificato qualitativamente il rischio, devono essere definiti gli aspetti quantitativi del problema, mediante lo studio della relazione tra la dose efficace del composto in esame e la probabilità che si verifichino effetti tossici nell'uomo. I risultati ottenuti saranno confrontati con quelli relativi all'esposizione umana (stima dell'esposizione), per ottenere una stima quantitativa del rischio.

Per valutare la relazione dose/risposta generalmente non sono disponibili dati sull'uomo perciò le informazioni sono ottenute da sperimentazioni condotte *in vitro* o *in vivo* su animali da esperimento, generalmente saggiando concentrazioni molto elevate degli agenti in questione ed effettuando delle estrapolazioni per dosi più basse.

In conclusione, i test *in vitro* e *in vivo* presentati in questo articolo, pur essendo lo strumento migliore per la valutazione potenziale del rischio per la salute umana derivante da alcuni composti, devono essere completati mediante studi di epidemiologia molecolare il cui scopo è di evidenziare, attraverso l'analisi di specifici biomarcatori, alterazioni precoci dell'organismo, che possono essere associate all'insorgenza di patologie cronico-degenerative.

Infatti, le diverse capacità metaboliche e i polimorfismi genici, possono creare le basi per differenze interindividuali nel rischio di sviluppare il cancro. Tale fenomeno è poco rilevante per il singolo individuo, mentre è molto rilevante per la popolazione, in quanto i polimorfismi associati a un maggior rischio sono molto diffusi così come ampiamente diffusa è l'esposizione ai cancerogeni ambientali.

Dichiarazione di conflitto di interesse

Gli autori dichiarano di non aver ricevuto alcun finanziamento per il seguente studio e di non aver alcun interesse finanziario nell'argomento trattato o nei risultati ottenuti.

Bibliografia

1. Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation research*. 1975 Dec;31(6):347-64. PubMed PMID: 768755.
2. Au WW, Bechtold WE, Whorton EB, Jr., Legator MS. Chromosome aberrations and response to gamma-ray challenge in lymphocytes of workers exposed to 1,3-

- butadiene. *Mutation research*. 1995 Apr;334(2):125-30. PubMed PMID: 7885363.
3. Barale R. Monitoraggio della genotossicità in matrici ambientali: aria. In: Migliore L, editor. *Mutagenesi ambientale*. San Lazzaro: Zanichelli; 2004. p. 248-62.
 4. Barale R, Zucconi D, Giorgelli F, Carducci AL, Tonelli M, Loprieno N. Mutagenicity of airborne particles from a nonindustrial town in Italy. *Environmental and molecular mutagenesis*. 1989;13(3):227-33. PubMed PMID: 2468490.
 5. Barale R, Giorgelli F, Scarpato R, Scapoli C, Loprieno N, Barrai I. Correlation between mutagenicity of airborne particles and air pollution parameters in eleven Italian towns. *International journal of environmental health research*. 1991 Mar;1(1):37-53. PubMed PMID: 26927845.
 6. Baumann PC. Hepatic Tumor Rates and Polynuclear Aromatic Hydrocarbon Levels in Two Populations of Brown Bullheads (*Ictalurus nebulosus*). In: Cooke MW, Dennis AJ, Fisher GL, editors. *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Sixth International Symposium on Physical and Biological Chemistry*. Ohio: Battelle Press, Columbus; 1982. p. 93-102.
 7. Baumann PC, Harshbarger JC. Long Term Trends in Liver Neoplasm Epizootics of Brown Bullhead in the Black River, Ohio. In: Michael Gilbertson, Glen A. Fox, William W. Bowerman, editors. *Trends in Levels and Effects of Persistent Toxic Substances in the Great Lakes: Springer Netherlands*; 1998. p. 213-23.
 8. Bedetti C, Barbaro MC, Rossi AM. Le sostanze chimiche, l'ambiente e noi: spunti per un'azione didattica. Sanità ISd, editor. Roma: Settore Attività Editoriali - Servizio Informatico, Documentazione, Biblioteca ed Attività Editoriali; 2007.
 9. Benzer S. On the Topography of the Genetic Fine Structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1961 Mar;47(3):403-15. PubMed PMID: 16590840. Pubmed Central PMCID: 221592.
 10. Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation research*. 2003 Jun;543(3):251-72. PubMed PMID: 12787816.
 11. Bolognesi C, Bonassi S, Knasmueller S, Fenech M, Bruzzone M, Lando C, et al. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis. *Mutation research Reviews in mutation research*. 2015 Oct-Dec;766:20-31. PubMed PMID: 26596545.
 12. Bolognesi C, Venier P. Monitoraggio della genotossicità in matrici ambientali: acqua. In: Migliore L, editor. *Mutagenesi ambientale*. San Lazzaro: Zanichelli; 2004. p. 263-80.
 13. Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. *Environmental health perspectives*. 1987 Oct;74:3-9. PubMed PMID: 3691432. Pubmed Central PMCID: 1474499.
 14. Comunità Europea. Trattato Di Amsterdam che modifica il trattato sull'Unione Europea, i trattati che istituiscono le Comunità Europee e alcuni atti connessi Lussemburgo: Ufficio delle pubblicazioni ufficiali delle Comunità europee, 1997.
 15. Countryman PI, Heddle JA. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation research*. 1976 Dec;41(2-3):321-32. PubMed PMID: 796719.
 16. Davidson JF, Guo HH, Loeb LA. Endogenous mutagenesis and cancer. *Mutation research*. 2002 Nov 30;509(1-2):17-21. PubMed PMID: 12427528.
 17. DeMeo MP, Merono S, DeBaille AD, Botta A, Laget M, Guiraud H, et al. Monitoring exposure of hospital personnel handling cytostatic drugs and contaminated materials. *International archives of occupational and environmental health*. 1995;66(6):363-8. PubMed PMID: 7782118.
 18. Farnetani I, Romano Spica V. Acqua e salute per la popolazione. Gruppo di lavoro Scienze Motorie per la Salute- Società Italiana di Igiene MPeSP, editor. Afragola: Soc. Coop. Grafica ETICA srl; 2016.
 19. Feretti D, Ceretti E, De Donno A, Moretti M, Carducci A, Bonetta S, et al. Monitoring air pollution effects on children for supporting public health policy: the protocol of the prospective cohort MAPEC study. *BMJ open*. 2014;4(9):e006096. PubMed PMID: 25227631. Pubmed Central PMCID: 4166251.
 20. Gallo V, Khan A, Gonzales C, Phillips DH, Schoket B, Gyorffy E, et al. Validation of biomarkers for the study of environmental carcinogens: a review. *Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*. 2008 Aug;13(5):505-34. PubMed PMID: 18979642.
 21. Grandjean P. Biomarkers in epidemiology. *Clinical chemistry*. 1995 Dec;41(12 Pt 2):1800-3. PubMed PMID: 7497635.
 22. Gupta RC, Lutz WK. Background DNA damage for endogenous and unavoidable exogenous carcinogens: a basis for spontaneous cancer incidence? *Mutation research*. 1999 Mar 08;424(1-2):1-8. PubMed PMID: 10232953.
 23. Izzotti A. Inquinamento dell'acqua e rischi genotossici. In: Gruppo di lavoro Scienze Motorie per la Salute- Società Italiana di Igiene MPeSP, editor. *Acqua e salute per la popolazione*. Afragola: Soc. Coop. Grafica ETICA srl; 2016.
 24. Izzotti A, Balansky RM, Cartiglia C, Camoirano A, Longobardi M, De Flora S. Genomic and transcriptional alterations in mouse fetus liver after transplacental exposure to cigarette smoke. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2003 Jun;17(9):1127-9. PubMed PMID: 12709406.
 25. Izzotti A, Kanitz S, D'Agostini F, Camoirano A, De Flora S. Formation of adducts by bisphenol A, an endocrine disruptor, in DNA in vitro and in liver and mammary tissue of mice. *Mutation research*. 2009 Sep-Oct;679(1-2):28-32. PubMed PMID: 19660573.
 26. La conferenza permanente per i rapporti tra Stato, le Regioni e le Province Autonome di Trento e Bolzano. *Provvedimento di Linee-Guida per la sicurezza e la salute dei lavoratori esposti a chemioterapici antitumorali in ambiente sanitario*, (07 October 1999).
 27. Migliore L. La mutazione genica. In: Migliore L, editor. *Mutagenesi ambientale*. San Lazzaro: Zanichelli; 2004. p. 8-31.
 28. Mitelman F. Chromosomes, genes, and cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1994 May-Jun;44(3):133-5. PubMed PMID: 7621066.
 29. Newman MA, Valanis BG, Schoeny RS, Hee SQ. Urinary biological monitoring markers of anticancer drug

- exposure in oncology nurses. American journal of public health. 1994 May;84(5):852-5. PubMed PMID: 8179062. Pubmed Central PMCID: 1615027.
30. Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and biophysical research communications. 1984 Aug 30;123(1):291-8. PubMed PMID: 6477583.
 31. Pavanello S, Clonfero E. Biological indicators of genotoxic risk and metabolic polymorphisms. Mutation research. 2000 Oct;463(3):285-308. PubMed PMID: 11018745.
 32. Perera F. New approaches in risk assessment for carcinogens. Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis. 1986 Jun;6(2):195-201. PubMed PMID: 3615989.
 33. Rossi AM. Il monitoraggio delle sostanze esogene. In: Migliore L, editor. Mutagenesi ambientale. San Lazzaro: Zanichelli; 2004. p. 263-80.
 34. Simi S, Migliore L. Test in vitro con cellule di mammifero. In: Migliore L, editor. Mutagenesi ambientale. San Lazzaro: Zanichelli; 2004. p. 198-223.
 35. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental cell research. 1988 Mar;175(1):184-91. PubMed PMID: 3345800.
 36. Singh NP, Tice RR, Stephens RE, Schneider EL. A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. Mutation research. 1991 Jun;252(3):289-96. PubMed PMID: 2052008.
 37. Sorsa M, Anderson D. Monitoring of occupational exposure to cytostatic anticancer agents. Mutation research. 1996 Aug 17;355(1-2):253-61. PubMed PMID: 8781586.
 38. Sottani C, Tranfo G, Faranda P, Minoia C. Highly sensitive high-performance liquid chromatography/selective reaction monitoring mass spectrometry method for the determination of cyclophosphamide and ifosfamide in urine of health care workers exposed to antineoplastic agents. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 2005;19(19):2794-800. PubMed PMID: 16144038.
 39. Sottani C, Rinaldi P, Leoni E, Poggi G, Teragni C, Delmonte A, et al. Simultaneous determination of cyclophosphamide, ifosfamide, doxorubicin, epirubicin and daunorubicin in human urine using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry: bioanalytical method validation. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 2008 Sep;22(17):2645-59. PubMed PMID: 18666202.
 40. Sottani C, Leoni E, Porro B, Montagna B, Amatu A, Sottotetti F, et al. Validation of an LC-MS/MS method for the determination of epirubicin in human serum of patients undergoing drug eluting microsphere-transarterial chemoembolization (DEM-TACE). Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences. 2009 Nov 01;877(29):3543-8. PubMed PMID: 19783235.
 41. Sram RJ, Rossner P, Peltonen K, Podrazilova K, Mrackova G, Demopoulos NA, et al. Chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, cells with high frequency of SCE, micronuclei and comet assay parameters in 1, 3-butadiene-exposed workers. Mutation research. 1998 Nov 09;419(1-3):145-54. PubMed PMID: 9804932.
 42. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and molecular mutagenesis. 2000;35(3):206-21. PubMed PMID: 10737956.
 43. Timbrell JA. Biomarkers in toxicology. Toxicology. 1998 Aug 07;129(1):1-12. PubMed PMID: 9769106.
 44. Tortora CJ, Funke BR, Case CL. Elementi di Microbiologia. Firenze: Mondadori-Pearson; 2008.
 45. Tucker JD, Preston RJ. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. Mutation research. 1996 Sep;365(1-3):147-59. PubMed PMID: 8898995.
 46. Turci R, Fiorentino ML, Sottani C, Minoia C. Determination of methotrexate in human urine at trace levels by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 2000;14(3):173-9. PubMed PMID: 10637424.
 47. Turci R, Sottani C, Schierl R, Minoia C. Validation protocol and analytical quality in biological monitoring of occupational exposure to antineoplastic drugs. Toxicology letters. 2006 Apr 10;162(2-3):256-62. PubMed PMID: 16246507.
 48. World Health Organization- International Programme on Chemical Safety. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles / published under the joint sponsorship of the United Nations environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization. Geneva : World Health Organization: 1993.

Corrispondenza e richiesta estratti:

Massimo Moretti
Dipartimento di Scienze Farmaceutiche
Università degli Studi di Perugia
massimo.moretti@unipg.it