



# Tossicologia degli inquinanti ambientali

**Prof Claudia Cristiano**  
*claudia.cristiano@unina.it*

# Malattie correlate all'inquinamento

---

- Allergie
- Patologie Cutanee
- Irritazione ed infiammazione delle vie aeree, pneumopatie
- Interferenti endocrini
- Patologie del Sistema Nervoso
- Patologie Oncologiche

# **Interferenti endocrini**

# Interferenti endocrini

---

Gli **interferenti endocrini** sono sostanze esogene che interferiscono col naturale sistema endocrino, causando danni agli individui esposti nonché ai loro discendenti, anche parecchio tempo dopo l'esposizione.

Queste sostanze, principalmente prodotte dall'uomo, si possono trovare in pesticidi, additivi o contaminanti nel cibo e nei prodotti per l'igiene personale.

L'esposizione a queste sostanze avviene tramite ingestione, inalazione e contatto con la pelle.

Gli effetti degli interferenti endocrini sono stati finora associati con **alterazioni della riproduzione in uomini e donne, ritardi nello sviluppo neurale infantile, alterazioni del sistema immunitario**.

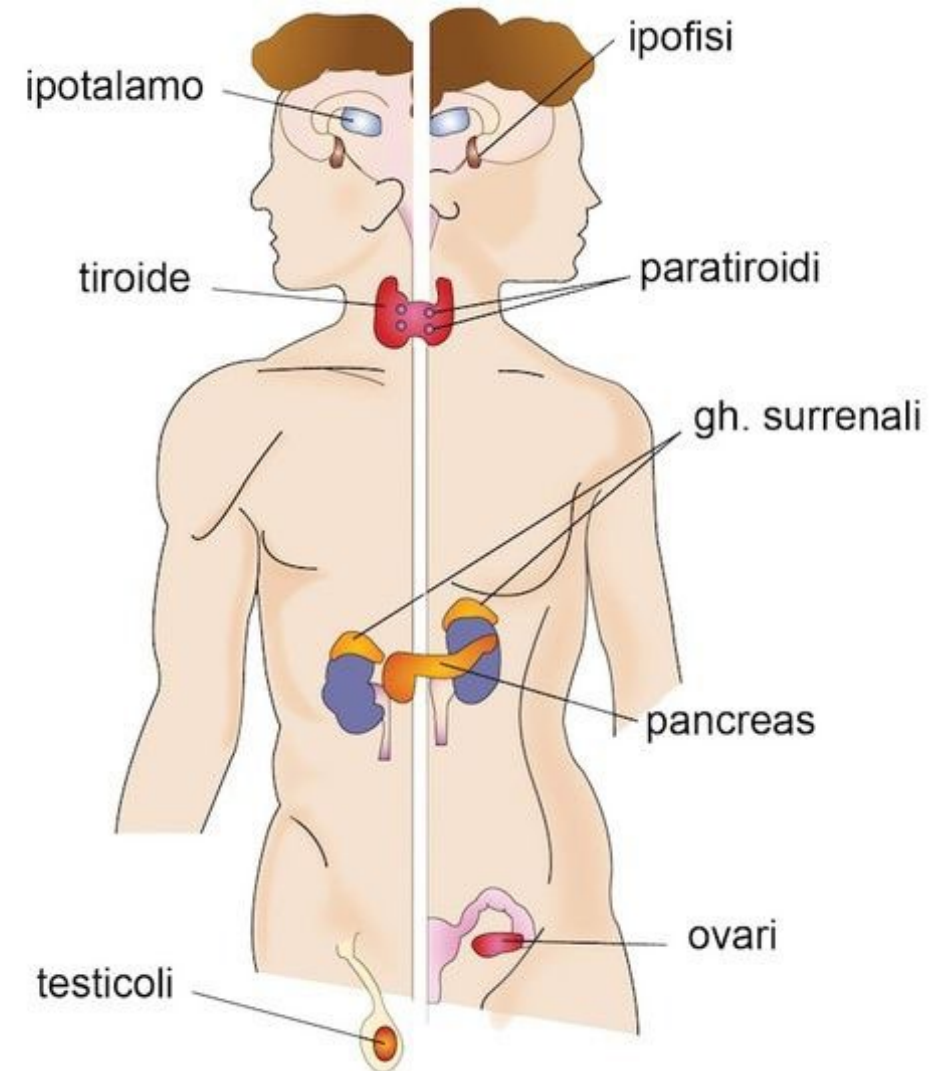
Essi possono essere inoltre trasferiti dalla madre al feto, attraverso la placenta, e al neonato, tramite il latte materno. L'esposizione a queste sostanze durante queste fasi così delicate dello sviluppo è la più pericolosa e gli effetti possono rimanere silenti per diversi anni.

# Cos'è il sistema endocrino?

Con sistema endocrino, o ormonale, si intende l'insieme delle **ghiandole endocrine** dell'organismo, le quali agiscono in maniera interdipendente le une dalle altre ed in collaborazione con il sistema nervoso.

Questo sistema si basa su una fine regolazione della produzione di ormoni di diversa natura. Esso gioca un ruolo centrale in tutti i vertebrati, controllando importanti funzioni biologiche quali metabolismo, sviluppo, riproduzione e comportamento.

Il delicato funzionamento del sistema endocrino potrebbe essere a rischio, per via del sempre crescente numero di contaminanti che possono accumularsi nell'organismo.



# Meccanismo d'azione degli interferenti endocrini

---

Esistono ad oggi migliaia di composti chimici classificati come “interferenti endocrini” (endocrine disrupting chemicals).

I meccanismi d'azione tramite i quali queste sostanze possono produrre i loro effetti sono:

- **interazione diretta con i recettori degli ormoni.** Questa interazione, causata dalla loro somiglianza strutturale con gli ormoni endogeni, può, da un lato causare un'anomala attivazione del recettore stesso, dall'altro bloccare il legame con l'ormone naturale.
- **interazione con elementi della via di segnalazione ormonale** che si trovano a valle del recettore
- **alterazione dei livelli di espressione e/o turnover dei recettori ormonali**
- **modificazione della sintesi o metabolismo degli ormoni.** Alcune di queste sostanze possono alterare la quantità di lipidi nel sangue o alterare direttamente l'attività degli enzimi responsabili dei processi di sintesi o degradazione degli ormoni
- **alterazione del trasporto degli ormoni nel sangue**

# Effetti sulla salute

---

## Effetti sul sistema riproduttore

Considerando il fatto che la struttura chimica della maggior parte degli interferenti endocrini mima quella degli ormoni gonadici e ha la capacità quindi di legarsi ai loro recettori, il sistema riproduttore è il più vulnerabile all'azione di queste sostanze.

## Effetti sulla pubertà

Ad oggi diversi studi sembrano dimostrare una correlazione tra l'esposizione a interferenti endocrini e alterazioni dell'età della pubertà nei paesi occidentali. Per esempio, l'esposizione in utero e postnatale a pesticidi clorurati (DDT), PBDE, ftalati e BPA è stata correlata con un anticipo dell'età del menarca, che risultava più rilevante laddove l'esposizione era avvenuta per tempi più lunghi.

## Effetti sulla fertilità

L'esposizione agli interferenti endocrini è stata associata ad una diminuzione della fertilità sia maschile che femminile. Queste sostanze possono danneggiare lo sviluppo ovarico, aumentare l'incidenza delle sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), allungare i tempi di concepimento, aumentare il rischio di aborti spontanei, inibire la produzione di testosterone, causare ipertrofia testicolare e diminuire la motilità spermatica.

# Effetti sulla salute

---

## Effetti sullo sviluppo neurale

Gli interferenti endocrini hanno effetti particolarmente significativi sui processi di sviluppo neurale per via della loro capacità di accumularsi nei tessuti adiposi, di attraversare la placenta e di essere presenti nel latte materno. Per molti anni gli studi sugli effetti di diversi interferenti endocrini si sono concentrati solamente sulle reazioni a breve termine, dovute a esposizione ad alte dosi. Tuttavia, adesso è noto come l'esposizione durante il periodo prenatale a dosi molto più basse di quelle precedentemente considerate come nocive, può avere un effetto sul comportamento in maniera sessualmente dimorfica.

È interessante notare come vi sia un crescente aumento dell'incidenza di disturbi dello sviluppo quali disturbo da deficit dell'attenzione/iperattività e disordini dello spettro dell'autismo; entrambe queste categorie di disturbi sono fortemente dimorfiche tra maschi e femmine. Il differenziamento sessuale del cervello è un processo finemente regolato dagli ormoni steroidei durante lo sviluppo postnatale. Di conseguenza, è facile immaginare come alterazioni di questa fase possano aumentare il rischio di insorgenza di certe malattie.

# Interferenti endocrini

---

## **Policlorobifenili (PCB)**

Queste sostanze sono state associate a difetti dello sviluppo neurale, quozienti intellettivi più bassi, problemi di attenzione, memoria e movimenti fini, come la scrittura, così come comportamenti antisociali, come per esempio un aumento dell'aggressività.

## **Eteri di difenile polibromurato (PBDE)**

Associati con alterazioni del comportamento e, soprattutto, problemi di iperattività.

## **Bisfenolo A (BPA)**

Si è potuto osservare che l'esposizione al BPA durante il periodo pre- o post-natale può alterare lo sviluppo di diversi circuiti neurali. Si è visto un collegamento tra queste sostanze e i disturbi dello spettro autistico ed un aumento di comportamenti atipici durante l'infanzia.

## **Pesticidi organofosfati**

Gli insetticidi organofosfati rappresentano il 50% di tutti i pesticidi utilizzati nel mondo pertanto sono stati per anni oggetto di studi che hanno identificato una neurotossicità acuta tramite iperstimolazione del sistema colinergico. Nuovi studi mostrano come l'esposizione in utero, o neonatale, a dosi anche molto basse di pesticidi organofosfati, influenzi lo sviluppo neurocomportamentale. In particolare, l'esposizione durante il terzo trimestre della gravidanza aumenta il rischio di insorgenza di autismo nel bambino del 60%.

## **Metalli pesanti**

Cadmio, piombo, mercurio.

# Effetti dei PFAS sulla salute umana

I **Pfas**, come tanti inquinanti chimici, non esistono naturalmente. Sono prodotti esclusivamente dalle attività umane e sono **interferenti endocrini** simulando il corretto funzionamento del sistema ormonale. PFOA e PFOS hanno una notevole affinità di legame con la proteina di legame degli ormoni tiroidei, **la transtiretina (TTR)** che si occupa del trasporto di ormoni tiroidei: tiroxina (T4) e triiodotironina (T3).

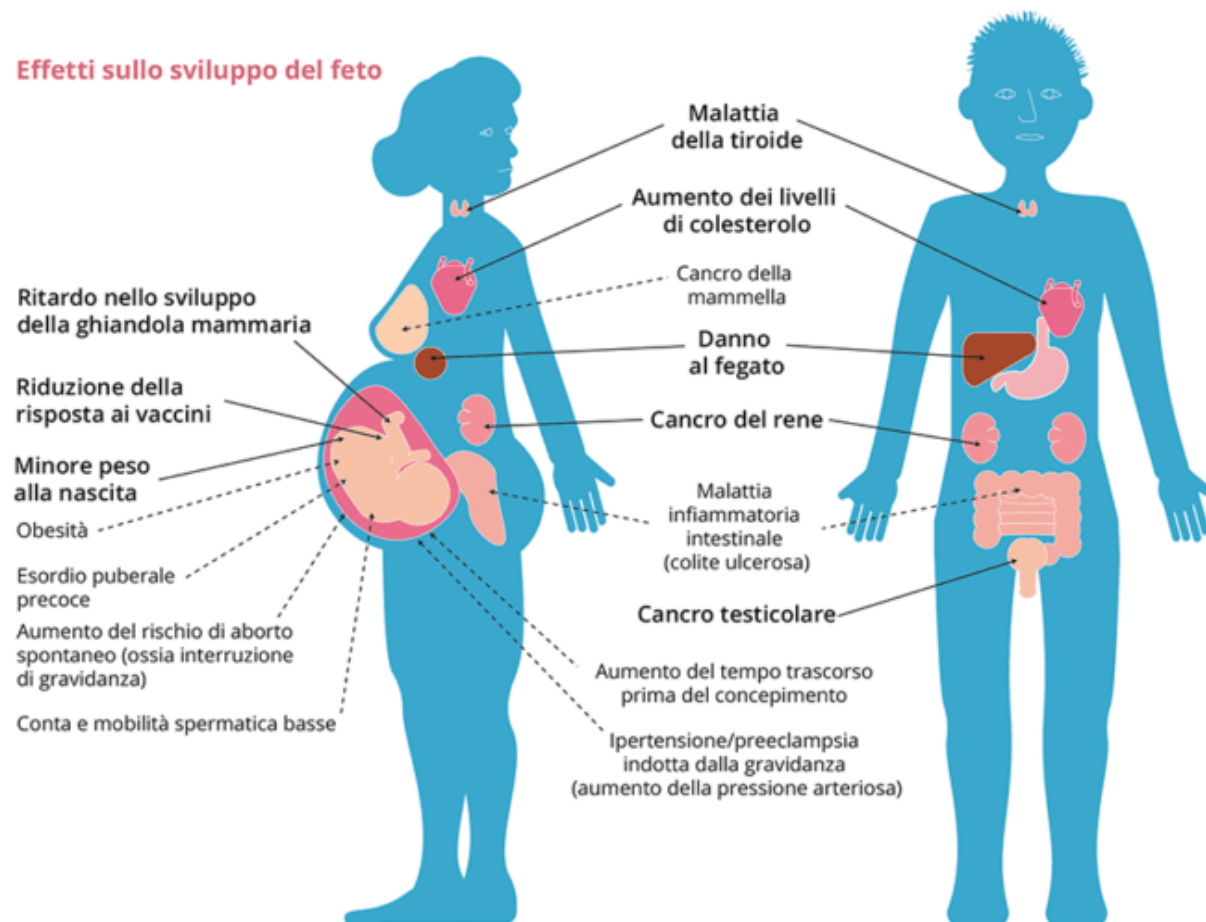
Il bioaccumulo di queste sostanze può rendere **inefficaci i vaccini**.

Purtroppo, sono utilizzati in tantissimi prodotti, ad esempio i contenitori dei fast food possono essere rivestiti di Pfas. Gli inquinanti che rivestono questi contenitori possono essere trasferiti all'alimento. Quindi, noi le mangiamo, le beviamo e le respiriamo.

In Veneto la contaminazione è tra le più alte del mondo.

— Elevata certezza  
- - - - Minore certezza

## Effetti sullo sviluppo del feto



# Effetti dei PFAS sulla salute umana

---

*Studi indicano che PFOA e PFOS possono portare conseguenze nella riproduzione, nello sviluppo, in fegato e reni e a livello immunologico.*

Esposizione cronica a PFOA può portare allo sviluppo di tumore ai testicoli, al pancreas e al fegato; mentre un'esposizione cronica a PFOS può causare tumore al fegato.

PFOA possono ridurre la produzione di linfociti (cellule del sistema immunitario) sia nel timo che nella milza e di impedire la risposta immunitaria umorale, mediata dalla secrezione di anticorpi prodotti nelle cellule dei linfociti di tipo B. Ciò può far diminuire la capacità dell'organismo di rispondere a infezioni batteriche. Gli PFOA possono inoltre intensificare la risposta immunitaria ad allergeni, aumentando la gravità delle allergie.

L'esposizione a PFOA e PFOS al di sopra di determinati livelli può comportare anche: disturbi degli ormoni tiroidei, conseguenze a livello del sistema immunitario e nello sviluppo dei feti durante la gravidanza o dei bambini allattati.

## **Studio danese sulla fertilità e gravidanza:**

In donne danesi alti livelli di PFOS e PFOA sono stati associati a un più lungo periodo di gravidanza e a un ciclo irregolare. Mentre in giovani danesi con alti livelli di queste sostanze nel sangue è stato riscontrato un numero dimezzato di spermatozoi rispetto ad altri uomini con livelli più bassi.

# Regolamentazione

---

Ad oggi, più di 800 sostanze chimiche sono state classificate come interferenti endocrini e l'Unione Europea si investe nel fare passi avanti per regolamentarne l'utilizzo.

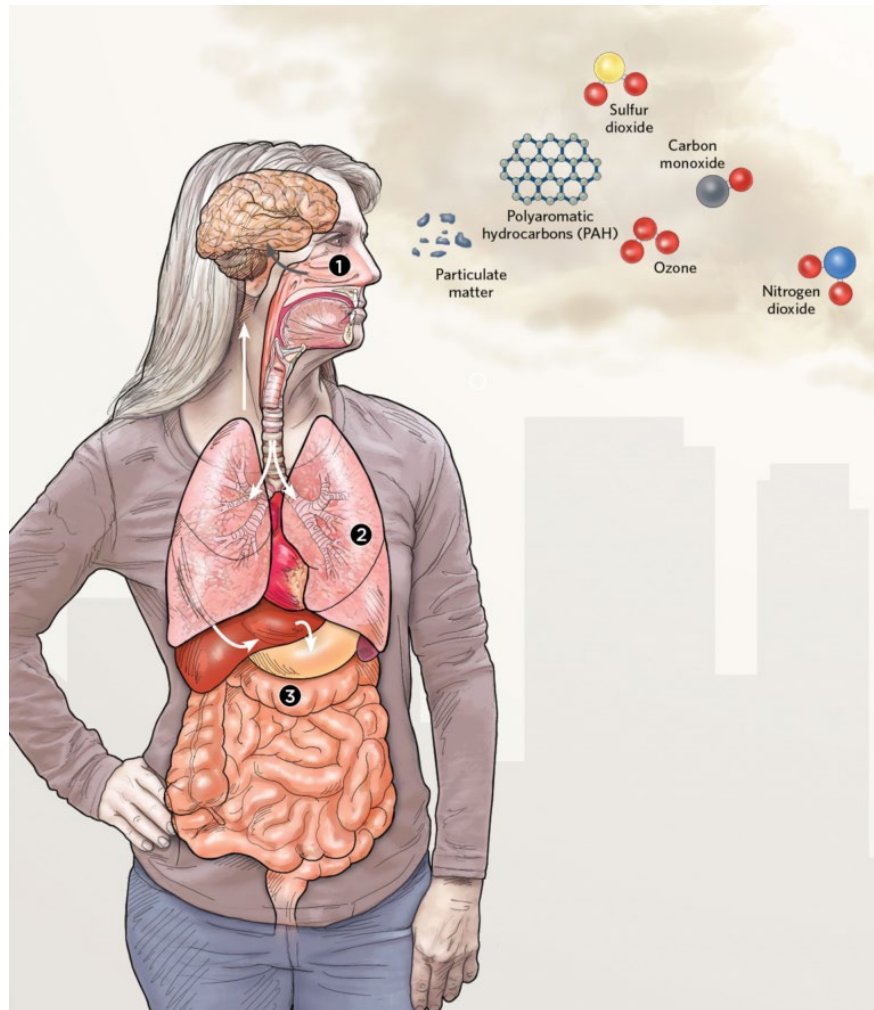
La strategia dell'Unione Europea punta principalmente a:

- ❑ **diminuire il più possibile l'esposizione agli interferenti endocrini**, soprattutto durante la gravidanza e la pubertà
- ❑ **accelerare e complementare**, laddove mancanti, **i processi di ricerca scientifica**, sui quali le decisioni della Commissione sono basate.

Tuttavia, vi è una problematica che emerge: le leggi contro l'utilizzo di queste sostanze portano al loro continuo rimpiazzo sul mercato con nuove sostanze, ad esse analoghe. Queste ultime tuttavia, finché non diventano oggetto di studio e non ne vengano provati eventuali effetti alteranti sul sistema endocrino, rimangono sul mercato.

# **Patologie sistema nervoso centrale**

# Modalità di ingresso



## 1. Attraverso il naso

*I contaminanti respirati attraverso il naso possono entrare in contatto diretto con il bulbo olfattivo.*

## 2. Inspirato nei polmoni

*La maggior parte dei gas può facilmente attraversare l'epitelio nei polmoni per penetrare nel flusso sanguigno. I contaminanti circolanti possono logorare la barriera emato-encefalica e / o attraversarla per interagire direttamente con il tessuto neurale.*

## 3. Attraverso l'intestino

*Le sostanze inquinanti che penetrano nell'intestino nell'aria ingerita possono essere assorbite dalla parete intestinale e nel flusso sanguigno, dove possono viaggiare fino al cervello.*

# Modalità di ingresso

---

- Respirati attraverso il naso, possono entrare in contatto diretto con il *bulbo olfattivo*. Il PM 2,5 può raggiungere la corteccia olfattiva e altre regioni del cervello, oppure possono attraversare l'epitelio nei polmoni per penetrare nel *flusso sanguigno* e logorare e/o attraversare la barriera ematoencefalica.
- L'esposizione al PM 2,5 aumenta la probabilità di ricovero per *malattia di Alzheimer e malattia di Parkinson*, per accumulo della *proteina beta amiloide*, componente delle placche senili tipiche della malattia di Alzheimer, e della *proteina alfa-sinucleina*, componente dei corpi di Lewy, la lesione cerebrale tipica della malattia di Parkinson.
- L'esposizione ad insetticidi, pesticidi, solventi, metalli pesanti come: arsenico, cadmio, mercurio, manganese e piombo ed il traffico urbano sono stati chiamati in causa come fattori di rischio per la *malattia di Parkinson*.
- Il rischio assoluto di sviluppare *schizofrenia* è maggiore per soggetti esposti dalla nascita all'età di 10 anni a concentrazioni medie quotidiane di NO<sub>2</sub> superiori a 26.5 µg/m<sup>3</sup>.
- Le sostanze inquinanti che penetrano *nell'intestino* possono essere assorbite dalla parete intestinale e nel flusso sanguigno dove possono viaggiare fino al cervello. Inoltre i *cambiamenti del microbioma* sono stati recentemente collegati alla funzione cognitiva (asse intestino- cervello).
- I meccanismi attraverso i quali l'inquinamento induce le patologie neurologiche non sono noti, ma studi recenti suggeriscono che l'infiammazione e lo stress ossidativo svolgono un ruolo cruciale nel danneggiamento del sistema nervoso centrale.

# Neurotossicità

---

In senso generale, si ricorre al termine **“neuropatia”** in riferimento a qualsiasi disturbo o condizione clinica che agisce sul corretto funzionamento del sistema nervoso.

Si parla, invece, di **neuropatia professionale** quando i disturbi sono legati all’attività lavorativa del paziente.

Sono, infine, considerate **“neurotossine”** tutte quelle sostanze tossiche che agiscono sulle cellule del sistema nervoso.

Naturalmente, la neurotossicità di una sostanza non esclude effetti su altri organi o tessuti.

Il sistema nervoso centrale è protetto dalle sostanze xenobiotiche grazie alla presenza della barriera ematoencefalica.

Le sostanze neurotossiche possono avere come bersagli:

➤ **il neurone**

➤ **Le cellule mielinizzanti**

➤ **Il sistema di neurotrasmissione**

# Disturbi centrali

---

## **DISTURBI DELL'ATTENZIONE (ADHD) E IPA**

E' dimostrato che gli IPA (Idrocarburi Policiclici Aromatici) possono essere alla base dei disturbi dell'attenzione, e a Taranto la massima fonte di IPA è stata l'ILVA. L'esposizione prenatale agli IPA aumenta le possibilità di sviluppare nei bambini ADHD di cinque volte superiore alla media.

## **APPRENDIMENTO E PIOMBO, MERCURIO, DIOSSINA, ARSENICO, IPA**

Ad abbassare il QI (Quoziente di Intelligenza) c'è oltre agli IPA anche il piombo, come hanno dimostrato le ricerche.

E poi vi sono mercurio, arsenico e altre sostanze che interferiscono con l'apprendimento.

Anche la diossina come interferente endocrino, può quindi comportare danni al sistema nervoso centrale e allo sviluppo intellettuale.

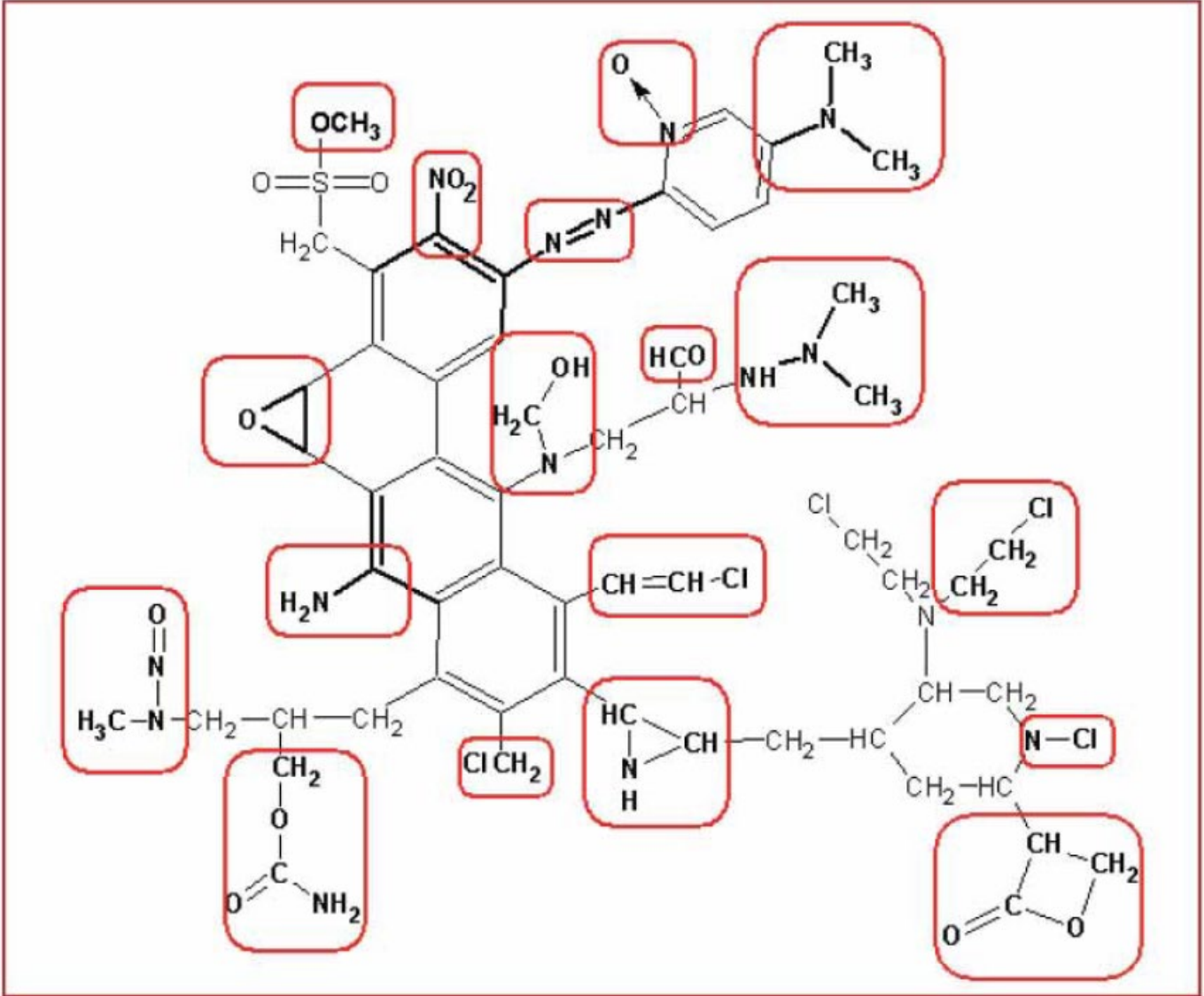
# **Patologie oncologiche**

# Patologie oncologiche

---

Fattore di rischio	% tumori attribuibili
<b>Fumo</b>	<b>33</b>
Sovrappeso/Obesità	5-10
Infezioni	8
Dieta	5
Fattori occupazionali	5
Alcol	3
<b>Inquinamento ambientale</b>	<b>2</b>
Radiazioni	2

# Rappresentazione di un ipotetico super-cancerogeno



# Patologie oncologiche

---

Uno studio tedesco pubblicato nel 2018 ha dimostrato che esiste un legame tra **un aumento di  $10\mu\text{g}/\text{m}^3$  di PM 10** e il rischio relativo di tumore alla **bocca** e alla **gola** (53%) e di tumore della **pelle** diverso dal melanoma (52%).

Meno forte, ma comunque significativo, l'aumento del rischio relativo per i tumori della **prostata** (23%) e del **seno** (19%).

# Smog e tumore al seno

---

Alcuni studi hanno evidenziato un'associazione tra insorgenza di tumore al seno e gli **ossidi di azoto** (prodotti soprattutto dalla combustione) con il particolato ultrafine **PM2,5**.

–C'è ancora tanto da capire, anche ad esempio quali siano gli effetti dell'inquinamento in giovane età poiché sappiamo che esiste un aumento del rischio di tumore al seno nelle donne che hanno iniziato a fumare da ragazzine non si può escludere un nesso simile con lo smog.

# Tumori professionali

---

L'OMS e le indagini di numerosi autori indicano che una forte percentuale di tumori umani (70-90%) sarebbe determinata da fattori ambientali.

Tali indicazioni si basano principalmente su indagini epidemiologiche eseguite su vaste comunità umane.

I **tumori professionali** sono definiti tali, quando nella loro genesi, ha agito, come causa o concausa, l'attività lavorativa, con esposizione ad agenti cancerogeni.

Non differiscono da quelli «spontanei» né clinicamente né sul piano anatomico-istologico.

# Cenni sulla cancerogenesi

---

Numerose ricerche di biologia molecolare sulla cancerogenesi chimica hanno consentito di formulare una teoria della cancerogenesi a due stadi:

- **Iniziazione** ad opera di sostanze cancerogene/mutagene.
- **Promozione** ad opera di sostanze o fattori fisici promotori.

Il bersaglio principale degli agenti oncogeni è costituito da macromolecole (proteine, RNA) e specialmente dal DNA.

Agenti cancerogeni:

- **Cancerogeni diretti:** capaci cioè d interagire direttamente con la molecole con cui vengono a contatto.
- **Precancerogeni:** interagiscono con il DNA dopo aver subito trasformazioni chimiche prevalentemente nel fegato (epossidi).

# Cenni sulla cancerogenesi

---

Il danno del DNA può essere **riparato**;

Una ridotta capacità di riparare tali danni o un sistema di riparazione errato che introduce mutazioni durante la resintesi del DNA possono causare la trasformazione di una cellula normale in una cancerosa.

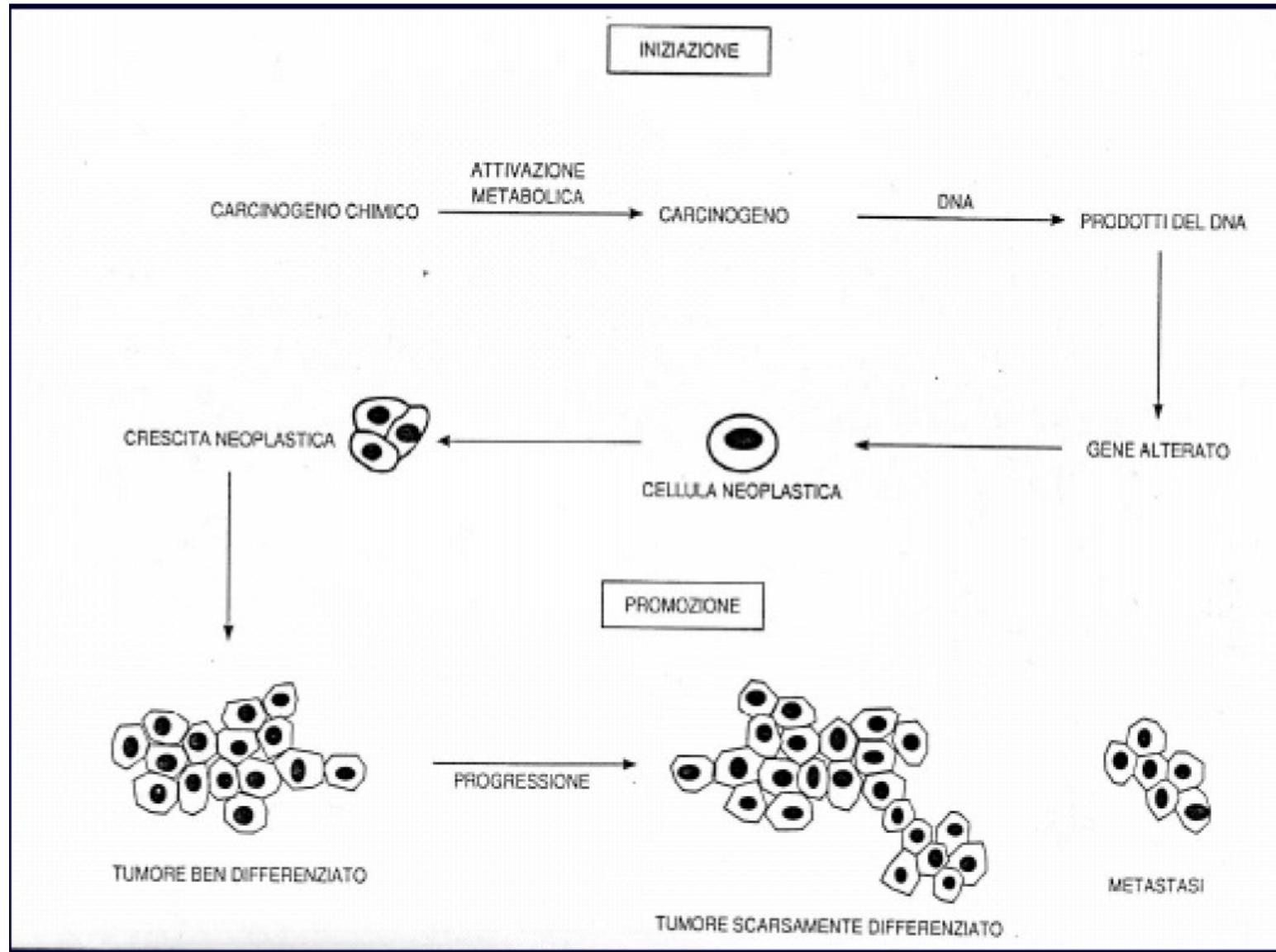
La mancata riparazione del DNA può determinare **lesioni cromosomiche** nelle cellule durante la divisione cellulare.

Il danno così causato costituirebbe la prima fase del processo di cancerogenesi (**INIZIAZIONE**).

La cellula trasformata può restare silente per moltissimo tempo (**PERIODO DI LATENZA**) finché stimoli di natura *infiammatoria, irritativa o proliferativa*, provocano la liberazione della cellula trasformata dal controllo della crescita e dal controllo immunologico (**PROMOZIONE**) dando luogo all'insorgenza del cancro.

Nei meccanismi dell'oncogenesi un ruolo determinante sarebbe svolto da geni di regolazione della crescita e differenziazione cellulare definiti *oncogeni*.

# Cenni sulla cancerogenesi



# Cenni sulla cancerogenesi

---

Per quanto riguarda la **cancerogenesi da agenti fisici**, è riconosciuta la capacità di indurre:

- neoplasie cutanee da parte dei **raggi UV**.
- leucemie e tumori vari da parte delle **radiazioni ionizzanti**.

Sebbene nella cancerogenesi da agenti fisici non sono in gioco i meccanismi metabolici che intervengono nella cancerogenesi chimica, poiché **l'evento mutageno indotto dalle radiazioni** non è di per sé sufficiente a produrre neoplasia clinica, anche qui sarebbero necessari **stimoli proliferativi aspecifici e specifici, fattori e alterazioni immunologiche**.

# Classificazione IARC dei cancerogeni

---

- ❑ **Gruppo 1:** cancerogeno per l'uomo (è stata stabilita una relazione causale tra esposizione e tumori umani).
- ❑ **Gruppo 2A:** probabilmente cancerogeno per l'uomo (è stata osservata un'associazione positiva tra esposizione e tumori nell'uomo per cui una esposizione causale è probabile, sebbene non si possano escludere completamente casualità, distorsioni o fattori di confondimento).
- ❑ **Gruppo 2B:** possibilmente cancerogeno per l'uomo (esiste evidenza di cancerogenicità per l'animale da esperimento, ma non adeguati dati sull'uomo).
- ❑ **Gruppo 3:** Sostanze non classificabili come cancerogeni per l'uomo (quando non è possibile applicarne una delle altre categorie).
- ❑ **Gruppo 4:** probabilmente non cancerogeni per l'uomo (non vi sono evidenze né per l'uomo né per l'animale da esperimento).

# Classificazione IARC dei cancerogeni

---

- Se i dati raccolti su una determinata sostanza **sono sufficientemente solidi e dimostrano inequivocabilmente che fa aumentare il rischio per un certo tipo di tumore**, quella stessa sostanza viene inserita nella classe 1, ovvero quella dei cancerogeni certi. A questa categoria appartengono 120 agenti, tra cui l'alcol, il fumo e i raggi UV.
- Quando, invece, i dati raccolti dalla IARC **non sono sufficienti ad emettere un giudizio certo o i dati raccolti sono contrastanti tra di loro**, la sostanza analizzata può essere inserita nelle rimanenti classi: 2A, 2B, 3 o 4.
- Generalmente si è portati a credere che le classi in cui sono suddivise le varie sostanze rappresentino una sorta di classifica di cancerogenicità. Ma non è così, poichè **non è vero che una sostanza in classe 2B sia meno rischiosa per l'uomo di una sostanza in classe 1.** La IARC, infatti, **non conduce valutazioni sul rischio delle sostanze, bensì suddivide gli agenti in base all'attendibilità degli studi condotti sugli stessi.** Di conseguenza, se una sostanza viene aggiunta alla classe 1 significa che gli studi che sono stati condotti sono stati sufficienti a dimostrare la sua cancerogenicità. Al contrario, se una sostanza si trova in classe 2B significa che gli studi analizzati dalla IARC non sono ancora abbastanza convincenti per definire cancerogena quella sostanza.

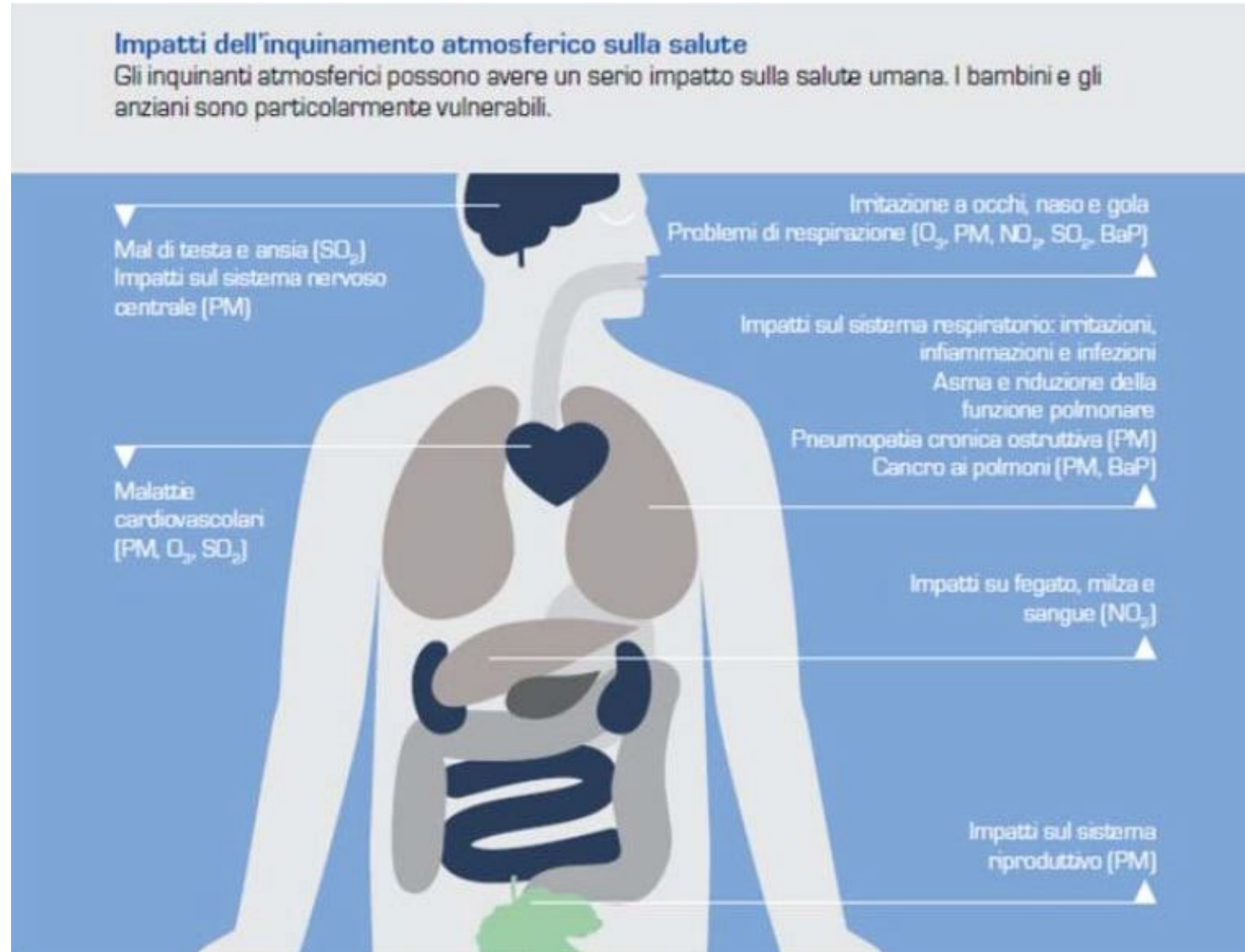
# Classificazione IARC dei cancerogeni

---

## Inquinamento atmosferico:

- Idrocarburi aromatici policiclici (1, 2A,2B)
- Benzene (1)
- 1-3 Butadiene (1)
- Formaldeide (1)
- Emissioni Diesel (2A)
- Emissioni Benzina (2B)

# Classificazione IARC dei cancerogeni



# E' un cancerogeno?

---

- ❑ La probabilità che una sostanza (o metabolita reattivo) alteri in modo decisivo geni coinvolti nella regolazione della divisione cellulare è molto bassa.
- ❑ Inoltre, i meccanismi di riparazione del DNA sono molto efficienti.
- ❑ La probabilità quindi che si arrivi alla fissazione del danno è estremamente bassa. Aumentando la dose di sostanza cancerogena si ha un aumento di questa probabilità.
- ❑ Aumento della percentuale di animali in cui si sviluppa il tumore (aumento dell'incidenza).

# E' un cancerogeno? Tipi di approccio

---

Per far fronte a tali difficoltà, negli anni sono stati sviluppati vari approcci.

Ci sono approcci **puramente qualitativi**: esperti umani si siedono a tavolino, guardano la formula della sostanza e in base alla loro esperienza stabiliscono se la sostanza contiene un'allerta strutturale.

Persone esperte riescono a dare spiegazioni e predizioni di portata non banale.

Esistono poi **approcci qualitativi o semi-quantitativi** che sono stati trasformati in programmi di computer come *Oncologic*, *DEREK*, *Multicase*. A eccezione di *Oncologic*, sono tutti prodotti commerciali. Questo tipo di approcci sono basati, di nuovo, essenzialmente sul riconoscimento di sottostrutture. Essi infatti sono sistemi molto efficaci per screening generali su grandi numeri di sostanze, e per stabilire delle priorità nella sperimentazione.

Studi di cancerogenesi animale (ratto, topo)

Studi di genotossicità a breve termine in vitro e in vivo

Studi epidemiologici

Altre informazioni: relazione struttura-attività e caratteristiche chimico-fisiche (PM, solubilità ecc.)


relazione attività-attività: tossicità generale (subcronica) e specifica (tossicità d'organo); tossicocinetica

# **Studio di cancerogenesi nei roditori (2 anni)**

---

**Specie:** ratti o topi, di entrambi i sessi.

**Durata:** mesi (l'intera vita dell'animale).

Con l'età, gli animali sviluppano normalmente tumori  è necessario comparare l'incidenza dei tumori nel gruppo trattato con quella di un gruppo di controllo, non trattato.

Lo studio a 2 anni è un buon modello per valutare il potenziale cancerogeno nell'uomo: tutti i cancerogeni umani noti sono risultati cancerogeni anche nell'animale, in opportune condizioni sperimentali (con la possibile eccezione dell'arsenico).

**Predittività:** per carcinogeni poco potenti, i risultati sono spesso di difficile interpretazione e possono dipendere in modo critico dalle condizioni sperimentali.

## **Limiti:**

- *Sensibilità del ceppo utilizzato:* utilizzare ceppi sensibili ma evitare l'uso di ceppi con incidenza spontanea di tumori (in un organo) molto elevata (dati poco utili per la valutazione del rischio nell'uomo);
- *Dose:* per aumentare la sensibilità si usa spesso, come dose più alta, la dose massima tollerata (MTD), (molto) più alta della dose prevista nell'uomo.
- *Falsi positivi:* Sostanze cancerogene nell'animale ma non nell'uomo.

# Agenti mutageni

---

## □ Agenti fisici

- Radiazioni ionizzanti
- Radiazioni UV

## □ Agenti chimici

- Metalli pesanti
  - Es: piombo, arsenico, nickel, cromo esavalente
- Composti organici
  - Es: idrocarburi policiclici aromatici

# Test di mutagenesi

---

Servono a rivelare se una sostanza è in grado di provocare mutazioni geniche.

Circa la metà dei carcinogeni noti (positivi al test di cancerogenesi animale a 2 anni) sono mutageni.

Mutazioni nelle cellule germinali possono provocare malattie ereditarie (es. fibrosi cistica) e concorrere a determinare malattie 'multifattoriali' quali diabete, ipertensione ecc.

Principio dei test: la mutazione deve produrre un cambiamento del fenotipo rilevabile mediante appropriate tecniche.

I test possono essere di diverso tipo e coinvolgere competenze completamente diverse:

- ★ **A breve termine:** forniscono risposte anche in 48 ore e il tipico esempio è il test di Ames
- ★ **A lungo termine:** sono in genere studi effettuati su popolazioni animali (es. roditori) in periodi medio-lunghi
- ★ **Studi epidemiologici:** valutano l'esposizione dell'uomo ad una singola sostanza

# Test di mutagenesi – Test di Ames

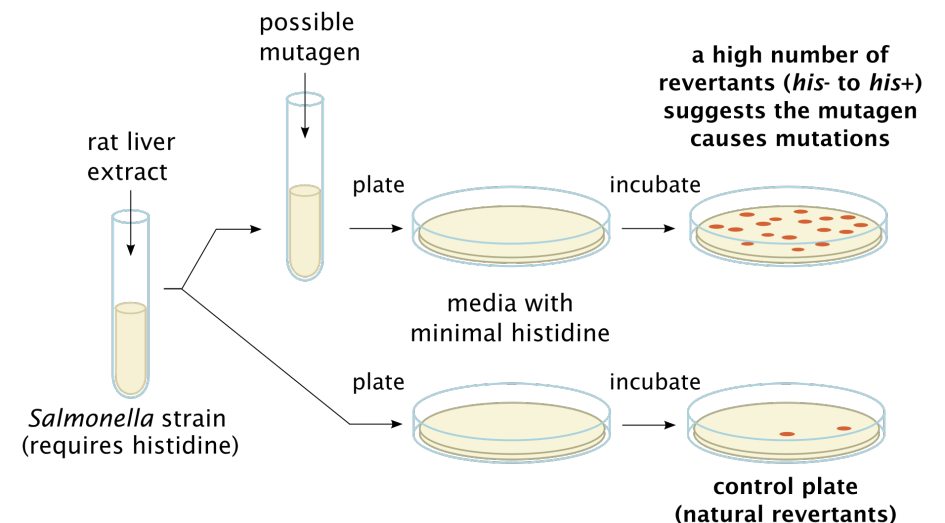
Questo test si basa sulla **reversione della mutazione (retromutazione)**. Il saggio si fonda sulla misurazione dell'abilità di microorganismi auxotrofi (ovvero incapaci di sintetizzare un prodotto essenziale per la loro sopravvivenza) di indurre la reversione di una mutazione e permettere loro di riacquisire la capacità di crescere in un ambiente privo di quella sostanza vitale (detti revertanti). Normalmente si impiegano ceppi di *Salmonella thyphimurium* che presentano un deficit nella via biosintetica dell'amminoacido **istidina** (His).

Nel centro si mette un dischetto imbevuto della sostanza da studiare, possibile mutageno. La sostanza diffonde nel terreno e se è mutagena può indurre mutazioni all'indietro in qualche batterio trasformando alcune salmonelle auxotrofe his - in his +.

A questo punto le piastre vengono incubate.

La maggior parte delle salmonelle non riesce a crescere perché nel terreno non c'è in quantità sufficiente il nutriente essenziale per la loro crescita. Invece i revertanti, cioè le salmonelle che hanno subito una mutazione all'indietro formeranno colonie intorno al dischetto.

Il test è veloce e richiede solo l'aggiunta di estratto di fegato di topo per rifornire il sistema di enzimi necessari per attivare l'azione mutagena.



# Test di mutagenesi – SOS/Cromo test

---

L' SOS/Cromo test è stato pensato come alternativa o complemento al test di Ames.

Vengono utilizzati ceppi di **E. coli** ingegnerizzati e si sfrutta uno dei meccanismi di riparazione del DNA presenti nelle cellule batteriche, il sistema SOS.

La sua attivazione consente al DNA di non interrompere la replicazione anche se è presente un danno in una sequenza; in altre parole la DNA polimerasi continua ad appaiare le basi azotate non rispettando la fedeltà al filamento originario.

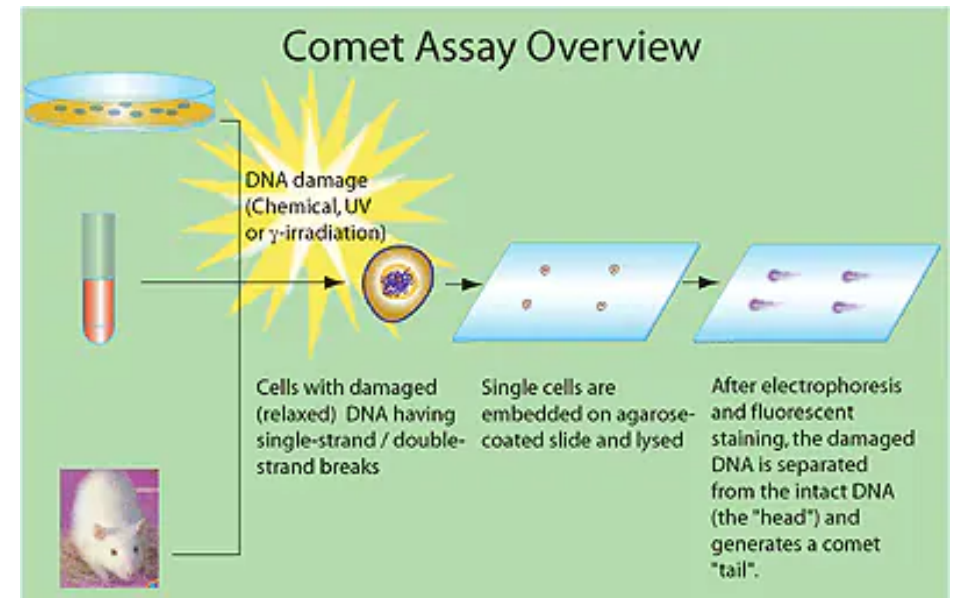
# Test di mutagenesi – Test della cometa

Il test della cometa, chiamato anche elettroforesi su singola cellula, viene effettuato sulle cellule di mammifero per verificare danni strutturali sui cromosomi. Sia rotture su un filamento che su ambedue i filamenti. In tutti e due i casi si formano frammenti di cromosomi.

In questo saggio, le cellule, sospese in agarosio liquido, vengono stratificate su un vetrino da microscopia, lisate con detergenti e soluzioni saline, poste in condizioni neutre o alcaline, e il DNA viene fatto correre in un campo elettroforetico. I vetrini così ottenuti, dopo colorazione, vengono osservati al microscopio a fluorescenza.

In assenza di danno, il nucleo risulta compatto e rotondeggiante.

Nel caso in cui vi siano rotture del DNA, i frammenti, carichi negativamente a livello dei gruppi fosfato, migreranno verso l'anodo, conferendo al materiale nucleare la morfologia di una cometa. In condizioni elettroforetiche neutre è possibile evidenziare rotture a doppia elica; in condizioni alcaline (pH 12,1), invece, si evidenziano le rotture a singolo filamento, poiché vengono a rompersi i legami idrogeno tra le basi azotate.



# Basta la mutazione?

---

- ❖ Perchè una mutazione si fissi bisogna:
  - Che l'errore sfugga agli enzimi del riparo
  - Che la cellula compia due cicli replicativi
  
- ❖ Perchè una mutazione abbia significato bisogna:
  - Che colpisca un gene fondamentale
  - Che la cellula non risponda ai meccanismi di controllo:
    - Proliferazione
    - Apoptosi