



quaderni
di Monitor
04>11

I risultati del progetto Monitor

**Gli effetti degli inceneritori
sull'ambiente e la salute
in Emilia-Romagna**

inceneritori
monitoraggio, ambiente, salute, comunicazione


monitor

Monitoraggio degli inceneritori nel territorio dell'Emilia-Romagna



LINEA PROGETTUALE 5

Valutazione degli effetti
tossicologici dell'aria prelevata
in prossimità degli impianti
di incenerimento

Responsabile: Annamaria Colacci, Arpa Emilia-Romagna

Azione 1 - Modelli in vitro per lo studio della risposta infiammatoria
Responsabile: Francesco Di Virgilio (Università di Ferrara)

Azione 2 - Studio dell'impatto ambientale da sostanze genotossiche
derivanti dall'attività degli impianti di incenerimento
Responsabile: Francesca Cassoni (Arpa Emilia-Romagna)

Azione 3 - Modelli in vitro predittivi del rischio cancerogeno
Responsabile: Monica Vaccari (Arpa Emilia-Romagna)

Azione 4 - Approcci di tossicogenomica per l'individuazione di profili genici di
espressione in linee cellulari esposte a particolato
Responsabile: Paola Silingardi (Arpa Emilia-Romagna)

Azione 5 - Valutazione del rischio cancerogeno
Responsabile: Sandro Grilli (Università di Bologna)

Azione 6 - Relazione conclusiva e supporto alla comunicazione
Responsabili: Annamaria Colacci (Arpa Emilia-Romagna)

Enti coinvolti:

Arpa Emilia-Romagna (Centro tematico regionale Cancerogenesi ambientale e
valutazione del rischio, Laboratorio tematico Mutagenesi ambientale)
Università di Bologna, Dipartimento di Patologia Sperimentale – Sezione di
Cancerologia
Università di Ferrara, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica
Università degli studi di Parma, Dipartimento di Genetica, Biologia dei
microrganismi, Antropologia, Evoluzione

I risultati ottenuti nella Linea progettuale 5 sono concordi nel mostrare un profilo tossicologico simile nei campioni di aria prelevati nel sito di massimo impatto dell'inceneritore (Frullo Est) e nel sito appartenente allo stesso dominio, ma non interessato dalla ricaduta dei fumi dell'impianto (Calamosco). Molti indici, anzi, imputano al sito Calamosco un'attività tossicologica più elevata. Inoltre l'analisi condotta esclude che ci sia un rischio cancerogeno legato all'attività dell'impianto. Sulla base dei risultati ottenuti si può concludere che la presenza dell'inceneritore considerato nello studio non incrementa il livello di inquinamento presente nell'area.

Introduzione

La base razionale di questa linea poggia sulla evidenza scientifica che l'esposizione ai contaminanti ambientali di vario genere può innescare una serie di eventi che si traducono in effetti a carattere acuto e cronico. La risposta più immediata è spesso di carattere infiammatorio. Gli effetti acuti, al perdurare dell'esposizione, tendono a cronicizzarsi e a creare un ambiente ideale per l'insorgenza di effetti più gravi e a lungo termine. È possibile delineare un percorso temporale che collega gli effetti immediati che conseguono all'esposizione con gli effetti più tardivi a carattere stocastico (figura 1).

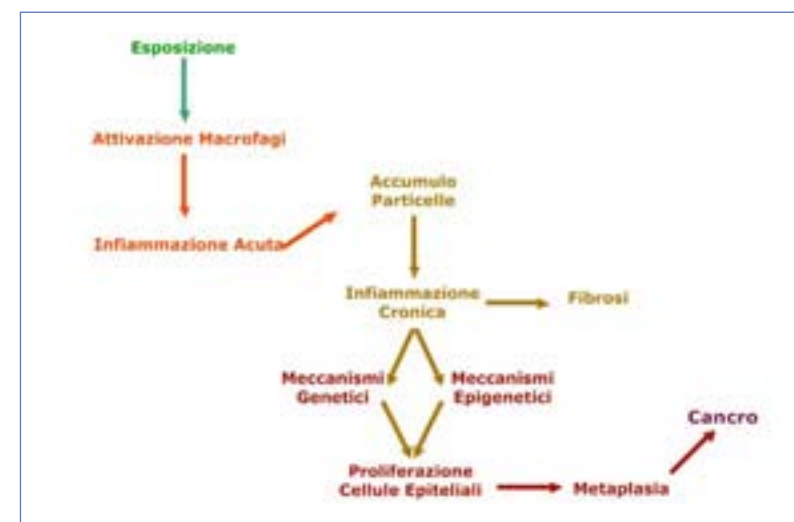


Fig. 1 Processo multifasico in risposta a insulti ambientali

Ci siamo, dunque, chiesti se fosse possibile tracciare a livello biologico e molecolare le diverse fasi della eventuale risposta a una esposizione ambientale puntiforme, quale quella rappresentata da un inceneritore, e identificare marcatori di esposizione precoci che potessero essere utili in una predizione di rischio per la salute umana.

Le conoscenze scientifiche sull'argomento erano (e sono) ancora piuttosto limitate, ma le evidenze riportate in letteratura confortano le scelte metodologiche operate (le voci bibliografiche sono a disposizione degli interessati).

Sulla base, dunque, dell'analisi della letteratura, delle pregresse esperienze delle singole unità operative afferenti alla linea progettuale e della discussione avvenuta in seno al Comitato Scientifico del progetto Monitor, sono state operate le opportune scelte metodologiche e concettuali per raggiungere l'obiettivo generale, consistente nell'evidenziare i possibili rischi per la salute della popolazione attualmente residente nelle aree interessate dalla ricaduta di un impianto di incenerimento.

Di seguito verranno descritti i punti principali delle metodologie adottate e dei principali risultati raggiunti, rimandando per maggiori dettagli alle relazioni delle singole azioni che costituiscono parte integrante del presente documento.

L'impianto di incenerimento e i siti di raccolta dei campioni

L'intera sperimentazione della Linea progettuale 5 (LP 5) è stata eseguita sull'inceneritore di Bologna, per brevità denominato Frullo, dall'ubicazione dell'impianto in Via del Frullo.

L'inceneritore del Frullo ha costituito il punto di riferimento di tutti gli approfondimenti metodologici e sperimentali operati nel progetto Monitor. Questo inceneritore, infatti, rappresentava, al momento in cui è stata operata la scelta, l'impianto tecnologicamente più avanzato presente nella regione Emilia-Romagna. L'impianto era già stato oggetto nel 2005 di una approfondita campagna di monitoraggio che aveva consentito di eseguire una prima valutazione dell'eventuale rischio derivante dall'esposizione e una comparazione con l'impianto dismesso, a cui l'attuale impianto andava a sostituirsi (per ulteriori approfondimenti: www.aria.provincia.bologna.it/progetti/progetti.html). Il vecchio impianto, a sua volta, era stato al centro di una campagna di monitoraggio, precedente (1998-2000) con una estesa caratterizzazione chimica (ma non tossicologica) dei campioni d'aria raccolti nelle immediate vicinanze. L'impianto attuale è inoltre al centro di un progetto di monitoraggio speciale che consentirà di raccogliere, anche negli anni a venire, informazioni più dettagliate utili per la caratterizzazione chimica e tossicologica dei campioni d'aria raccolti nei siti di ricaduta individuati nelle precedenti campagne di monitoraggio.

La storia pregressa dell'inceneritore di Bologna lo rendeva, dunque, l'implan-

to ideale non solo per rispondere alle esigenze immediate del presente studio, ma anche per analizzare le ricadute dell'evoluzione tecnologica in termini di riduzione del rischio per la salute umana.

Tutti questi aspetti sono stati considerati e approfonditi durante la ideazione e realizzazione dell'Azione 3 e dell'Azione 5 della LP 5, i cui principi metodologici erano già stati applicati nelle precedenti campagne di monitoraggio del Frullo. Sulla base del modello di ricaduta e dei siti evidenziati sono stati prescelti quattro siti di riferimento per la raccolta dei campioni d'aria, in particolare di PM2.5, per la caratterizzazione tossicologica eseguita nell'ambito delle azioni 1, 2, 3 e 4. L'Azione 5, invece, ha eseguito la valutazione e stima del rischio sulla base dei dati di caratterizzazione chimica eseguita su campioni raccolti su un numero più ampio di siti. Per facilitare la comprensione dei risultati si da qui di seguito una breve descrizione dei siti considerati.

Siti considerati negli studi sperimentali (azioni 1-4)

Frullo Est: rappresenta il punto di massima ricaduta dell'inceneritore, scelto, rispetto a Frullo Ovest, perché corrispondente al sito già oggetto di studi nella menzionata campagna di monitoraggio.

Calamosco: un sito adiacente al Frullo, ma posto sopravento in direzione Est, rispetto all'inceneritore. Secondo il modello di ricaduta adottato, su questo sito agiscono le stesse fonti di possibile contaminazione che influenzano l'area del Frullo, con esclusione dell'inceneritore stesso. Tale sito è stato scelto come "bianco" dell'inceneritore.

Giardini Margherita: un sito all'interno di un grande parco cittadino, situato a Sud-Ovest rispetto all'impianto del Frullo. Questa area rappresenta il fondo urbano, cioè il punto di minima contaminazione della città di Bologna. Tra l'altro, questa area gode di particolari condizioni di ricambio d'aria e questo rafforza maggiormente la scelta di questo sito come riferimento del minimo di esposizione urbana.

S. Pietro Capofiume: frazione del comune di Molinella (BO) sita a Nord-Est rispetto all'impianto di incenerimento, sede di una stazione meteorologica, scelto come sito rurale e, quindi, possibilmente rappresentativo del livello mi-

nimo di contaminazione dell'aria tra le aree considerate.

Ulteriori siti considerati nella stima del rischio cancerogeno (Azione 5)

Frullo Ovest: rappresenta il punto di massima ricaduta dell'inceneritore, scelto, specularmente a Frullo Est.

F19: un sito adiacente al Frullo, ma posto sopravento in direzione Ovest, rispetto all'inceneritore. Secondo il modello di ricaduta adottato, su questo sito agiscono le stesse fonti di possibile contaminazione che influenzano l'area del Frullo, con esclusione dell'inceneritore stesso. Tale sito è stato scelto come "bianco" dell'inceneritore.

Veduro: fondo rurale, posto all'interno del dominio.

Pianeta: massima influenza di tutte le fonti.

Nell'ambito del disegno sperimentale della LP 5, il profilo tossicologico dei campioni prelevati nel massimo del dominio (Frullo Est) è stato comparato con i profili ottenuti negli altri siti di confronto. Il disegno sperimentale risponde al quesito principale consistente nel definire se e quanto l'aria nel punto di massima ricaduta dell'impianto di incenerimento fosse più tossica e offrisse più rischi di quelli rilevati negli altri siti.

La linea progettuale e le azioni: overview

La Linea progettuale 5 (LP 5) consta di sei azioni. Le azioni 1-5 mirano ad approfondire i meccanismi d'azione che sottendono le fasi principali del processo che si innesca in risposta all'esposizione ambientale. L'Azione 6, al pari di quanto accade nelle altre linee progettuali di Monitor, ha una funzione di cerniera rispetto alle altre azioni e provvede alla comunicazione dei risultati e alla stesura della documentazione, ivi incluso il presente documento (vedi rapporto finale LP 7). La figura 2 offre una panoramica completa delle azioni.



Fig. 2 Panoramica degli endpoint analizzati e dei test utilizzati nelle azioni della LP 5

Modelli sperimentali e endpoint misurati

Una descrizione dei modelli e dei protocolli sperimentali utilizzati è riportata nelle relazioni conclusive delle singole azioni. Tuttavia è qui necessario evidenziare alcuni principi che hanno ispirato il disegno sperimentale dell'intera LP 5. Il progetto Monitor nasce in un momento in cui è particolarmente accesa l'attenzione verso i test tossicologici alternativi, in sostituzione dei test sull'animale. Pur nella consapevolezza che i tempi di una sostituzione totale dei test sull'animale siano ancora prematuri, l'utilizzo di test in vitro convalidati o in via di convalidazione internazionale, che prevedono l'utilizzo di cellule procarioti o eucarioti, e l'uso estensivo e intensivo di tecniche di biologia molecolare per identificare in marcatori molecolari, comuni e universali, di risposta all'esposizione, ha portato alla definizione di modelli sperimentali con un buon livello di predittività per gli endpoint proposti.

In questa ottica, la maggior parte dei modelli impiegati nella LP 5 ha fatto ricorso a test in vitro e all'uso di colture cellulari (tabella 1).

Si è anche cercato di convergere su modelli comuni o funzionali a più azioni per migliorare l'interpretazione comparativa dei dati ottenuti nelle diverse azioni e facilitare la chiave di lettura dei risultati in termini di rischio per la salute umana.

Di conseguenza, lo studio di tossicità, mutagenesi e cancerogenesi è stato condotto mediante una batteria di test, tutti convalidati o in via di convalidazione, di complessità crescente, i cui risultati consentono una valutazione complessiva e completa della capacità della miscela testata di indurre danni irreversibili e a lungo termine. In ognuno di questi test sono stati analizzati più endpoint, intesi come indicatori specifici dell'effetto considerato (tabella 2). Le attività dell'Azione 1 e dell'Azione 4 hanno prediletto l'utilizzo di modelli cellulari comuni, perché l'analisi in trascrittomica, con la identificazione dei geni modulati dall'esposizione, potesse eventualmente spiegare il meccanismo d'azione di risposta infiammatoria.

Tab. 1 Modelli biologici utilizzati nello studio

Origine	Nome identificativo	Descrizione
Batteri	Salmonella typhimurium TA 98, TA 100	Ceppi batterici, comunemente impiegati nel test di Ames (test di retromutazione)
Topo	J774	Linea macrofagica murina, derivata dalla stabilizzazione di un sarcoma di topo femmina BALB/c. particolarmente indicata per studiare la risposta monolitica-macrofagica in risposta a stimoli infiammatori
	BALB/c 3T3.	Linea di fibroblasti murini derivata da topo maschio BALB/c. Diversi cloni di questa linea sono utilizzati per lo studio della cancerogenesi in vitro (protocollo ECVAM in convalidazione)
Uomo	A549.	Linea stabilizzata di pneumociti derivata da un tumore in donna caucasica. Costituisce il modello di polmone più diffuso, anche recentemente proposto per supportare lo sviluppo di test alternativi di tossicità a dose-ripetuta (tossicità sub cronica e cronica)
	Humi	Linea normale (non trasformata), stabilizzata con virus SV40, ottenuta con cellule umane epiteliali di mammella
	T47D	Linea stabilizzata di cellule umane da carcinoma duttale, ottenute da effusione pleurica
	Leucociti	Leucociti periferici derivati da prelievo di sangue fresco di donatori sani non fumatori

Tab. 2 Endpoint misurati e loro significato biologico

Effetto analizzato	Modello/Test	Endpoint misurato	Significato biologico
Risposta Infiammatoria	cellule murine J774, pneumociti umani A549, monociti primari di donatori sani	Rilascio di ATP e di IL1-beta	Le molecole ricercate sono rilasciate come risposta immediata a uno stress cellulare
Danno genetico	Salmonella typhimurium (Test di Ames)	Retromutazioni	E' il test di elezione per individuare l'induzione di mutazioni puntiformi
	Comet assay (test della Cometa) in linfociti periferici	rotture a singolo e/o doppio filamento del DNA e siti in cui la struttura del DNA è deformata	Evidenza danno primario a carico del DNA nelle singole cellule non ancora riparato, né fissato.
	Micronucleo in linfociti periferici	Formazione di micronuclei (frammentazione del nucleo)	Evidenza rotture dei cromosomi (sostanze clastogene) o perdita dei medesimi (sostanze aneugeniche)
Danno epigenetico	Cellule BALB/c 3T3	Efficienza clonale	Risposta delle cellule all'effetto tossico di composti chimici
		Trasformazione cellulare	Consente di verificare le proprietà cancerogene dei composti chimici
Tossicogenomica	Cellule T47D, Humi, A549	Profili di espressione genica	Individuazione delle interazioni gene-ambiente in risposta a stress ambientali

I campioni analizzati

In linea generale, LP 5 si è focalizzata, come già ampiamente detto, sui campioni PM2.5 come indicatore della qualità dell'aria (PM2.5). Alcune azioni, tuttavia, hanno curato alcuni approfondimenti. Nell'Azione 1 sono stati analizzati anche campioni di PM10 di aria urbana. Nell'Azione 2 è stato curato anche un aspetto relativo ai terreni, sia terreni naturali prelevati negli stessi punti di raccolta dei campioni di aria sia terreni artificiali, preparati in laboratorio e posti in scatole di raccolta nei siti prescelti per tutti gli altri test. Sempre nell'Azione 2, sono stati analizzati anche gli aspetti di mutagenesi relativi ai campioni prelevati al camino nell'ambito dell'attività della linea progettuale 1 (LP 1). La tabella 3 offre una lettura sintetica della tipologia di campioni analizzati in ogni singola azione.

Tab. 3 Tipologia di campioni analizzati in ogni singola azione

Tipologia di campione	Az 1	Az 2	Az 3	Az 4	Az 5
Emissioni	-	✓	-	-	-
Terreni	-	✓	-	-	-
PM 2.5 Frullo	✓	✓	✓	✓	✓
PM 2.5 Calamosco	✓	✓	✓	✓	✓
PM 2.5 Giardini Margherita	✓	✓	✓	✓	✓
PM 2.5 S. Pietro Capofiume	✓	✓	✓	-	✓
PM10 aria urbana	✓	-	-	-	-

I campioni di aria PM2.5 sono stati raccolti in due periodi, riferiti alla stagione estiva (dal 13 giugno al 24 luglio 2008) e invernale (dal 14 gennaio al 9 marzo 2009).

Da tutti i filtri di raccolta giornaliera è stato ottenuto un unico estratto per stagione. L'estratto è stato suddiviso in aliquote e distribuito secondo le esigenze delle Unità Operative afferenti alla linea progettuale (UO) per le attività previste dalle azioni 1, 2, 3 e 4.

La scelta di ottenere dall'estrazione un unico campione è stata operata tenendo conto di due fattori, uno di carattere puramente contingente, determinato dalla necessità di volumi discretamente elevati di materiale da testare, non altrimenti ottenibili da ogni singolo filtro (o dalla coppia dei filtri raccolti giornalmente), l'altro dettato dagli obiettivi di base della LP 5, volti ad analizzare gli esiti di una esposizione media, prolungata e non gli episodi collegati a picchi di esposizione.

Una delle tappe più critiche è stata la scelta del solvente di estrazione che ha dovuto soddisfare i seguenti criteri: 1) essere in grado di estrarre la maggior parte degli inquinanti presenti nel particolato; 2) avere una tossicità tollerabile per il materiale biologico (batteri, cellule) con cui viene in contatto durante i test; 3) essere in grado di miscelarsi adeguatamente con i terreni di coltura, così da avere una soluzione omogenea. Dopo alcune prove preliminari, la scelta si è orientata sull'acetone.

Risultati di linea e considerazioni generali

I risultati ottenuti nelle singole azioni sono dettagliatamente descritti nelle relazioni di riferimento. Qui di seguito si cercherà di dare una interpretazione globale dei risultati raggiunti, di fornire una valutazione critica e di offrire suggerimenti per le azioni future.

L'attività di ricerca della LP 5 è stata condotta con l'intento di verificare l'impatto dell'inceneritore di Bologna, quale impianto modello, su una serie di endpoint in grado di disegnare un profilo tossicologico di campioni, che includono PM2.5 prelevato nei siti di raccolta identificati e descritti precedentemente, campioni prelevati al camino, e suoli interessati dalla ricaduta dell'inceneritore o rappresentativi degli altri siti.

Profilo tossicologico da endpoint biologici

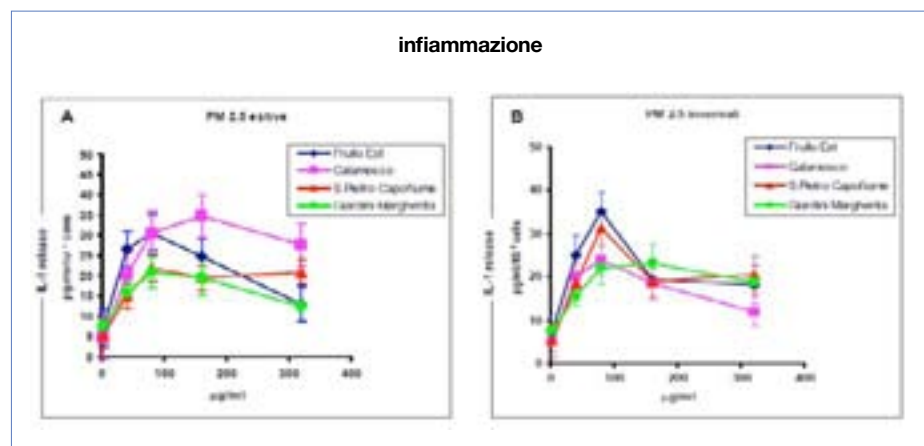
Per facilitare la comparazione dei dati, per ogni endpoint considerato viene fornita una tabella che identifica le concentrazioni di particolato utilizzate negli esperimenti. Come premessa essenziale, va ricordato che il contenuto di particolato nei filtri di raccolta riflette differenze stagionali, con i filtri della campagna invernale più "pesanti" di quelli raccolti nella campagna estiva.

Tab. 4 Volume campionato in ogni sito e corrispondenza in peso delle polveri

SITO	Estate			Inverno		
	Volume campionato (m ³)	peso polveri (mg)	µg/m ³	Volume campionato (m ³)	peso polveri (mg)	µg/m ³
Frullo Est	1245,14	29,05	23,33	1997,81	70,76	35,42
Calamosco	1242,33	26,22	21,11	2104,74	72,56	34,47
G. Margherita	1243,91	23,31	18,74	2106,20	62,26	29,56
S. Pietro C.	1243,49	17,27	13,89	2101,93	70,13	33,37

Negli endpoint biologici, volti a descrivere eventuali capacità del particolato di indurre effetti infiammatori, o più specificamente pro-infiammatori, tossici, mutageni e/o cancerogeni, non si osservano differenze significative fra i campioni raccolti nel sito Frullo Est (massimo impatto dell'inceneritore) da quelli raccolti nel sito di Calamosco, mentre i campioni relativi al fondo urbano (Giardini Margherita) e aria rurale (S. Pietro Capofiume) mostrano valori più bassi (con eccezione dei terreni di cui si dirà più avanti).

Proprietà infiammatorie



Corrispondenza metri cubi e milligrammi di particolato utilizzato nell'esperimento relativa alla Figura 3

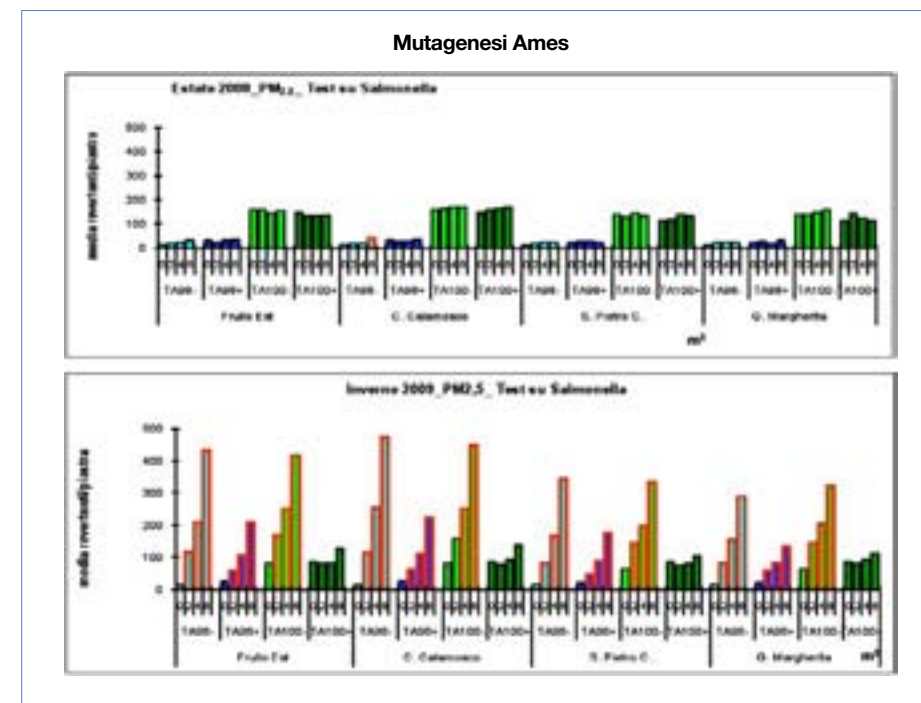
SITO	Estate 2008		Inverno 2009	
	m³	µg/ml	m³	µg/ml
Frullo Est	3,43	80	2,26	80
	6,86	160	4,52	160
	13,72	320	9,03	320
Calamosco	3,79	80	2,32	80
	7,58	160	4,64	160
	15,16	320	9,28	320
Giardini Margherita	4,27	80	2,71	80
	8,54	160	5,41	160
	17,08	320	10,83	320
S. Pietro Capofiume	5,76	80	2,40	80
	11,52	160	4,79	160
	23,04	320	9,59	320

Fig. 3 Studio comparativo dell'attività di rilascio di IL-1beta stimolata da particolato raccolto nei quattro siti prescelti. Monociti sono stati isolati dal sangue periferico di donatori, incubati in piastra (5 x 10⁵/ml/piastra, 24 piastre) per cinque giorni e poi esposti a particolato alle concentrazioni di 80, 160, 320 µg/ml per 6 ore. I dati sono riportati come media di tre repliche per punto per due donatori (totale sei repliche)

In fig. 3 si può notare una spiccata differenza fra il comportamento dei campioni raccolti in estate, dove il campione "Calamosco" è il più efficiente in indurre rilascio di IL1-beta, e quanto si osserva con i campioni invernali dove si ha un picco di rilascio più alto per i campioni Frullo e S. Pietro. Va tuttavia annotato che già alla dose 80 µg/ml (pari a circa 2.2 m³/ml) c'è un effetto tossico nelle cellule trattate, effetto che aumenta alle dosi di trattamento più elevate. A questa estesa tossicità si deve, probabilmente, una inibizione del rilascio di interleuchina.

Mutagenesi

Anche per il test di mutagenesi in Salmonella (Test di Ames, fig. 4) si nota uno spiccato effetto stagionale con tutti i campioni estivi non mutageni e tutti i campioni invernali positivi nel test. I campioni raccolti nel dominio (Frullo Est e Calamosco) risultano significativamente più mutageni rispetto ai campioni dell'area rurale e del fondo urbano. Il sito Calamosco mostra l'attività mutagena più elevata (fig. 5).



SITO	Estate 2008		Inverno 2009	
	m ³	µg	m ³	µg
Supersite	2	46,67	2	70,84
	4	93,33	4	141,67
	8	186,66	8	283,34
Chiesa Calamosco	2	42,21	2	68,95
	4	84,42	4	137,90
	8	168,84	8	275,79
S. Pietro Capofiume	2	27,79	2	66,74
	4	55,57	4	133,47
	8	111,13	8	266,93
Giardini Margherita	2	37,49	2	59,13
	4	74,97	4	118,25
	8	149,93	8	236,50

Fig.4 Studio comparativo dell'attività mutagenica (Test con Salmonella) di particolato raccolto nei quattro siti prescelti. Gli estratti dei campioni sono stati sottoposti a test di mutagenesi sui ceppi TA98 e TA100 di Salmonella typhimurium (metodo di incorporazione in piastra) in accordo con i metodi standard (Ames). Le piastre sono state trattate con 2, 4, 8 m³ di particolato. I dati sono riportati come media dei revertenti per piastra ad ogni dose saggiata. Le barre con la linea rossa rappresentano i risultati significativamente diversi dal controllo (T/C > 2). Supersite = Frullo EST

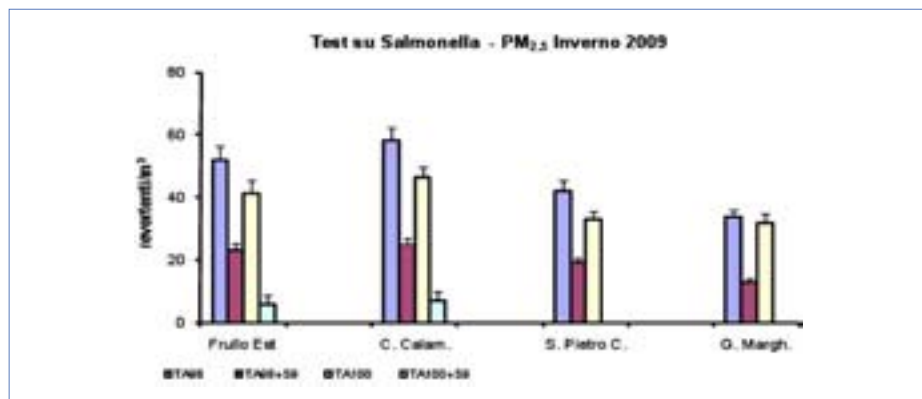
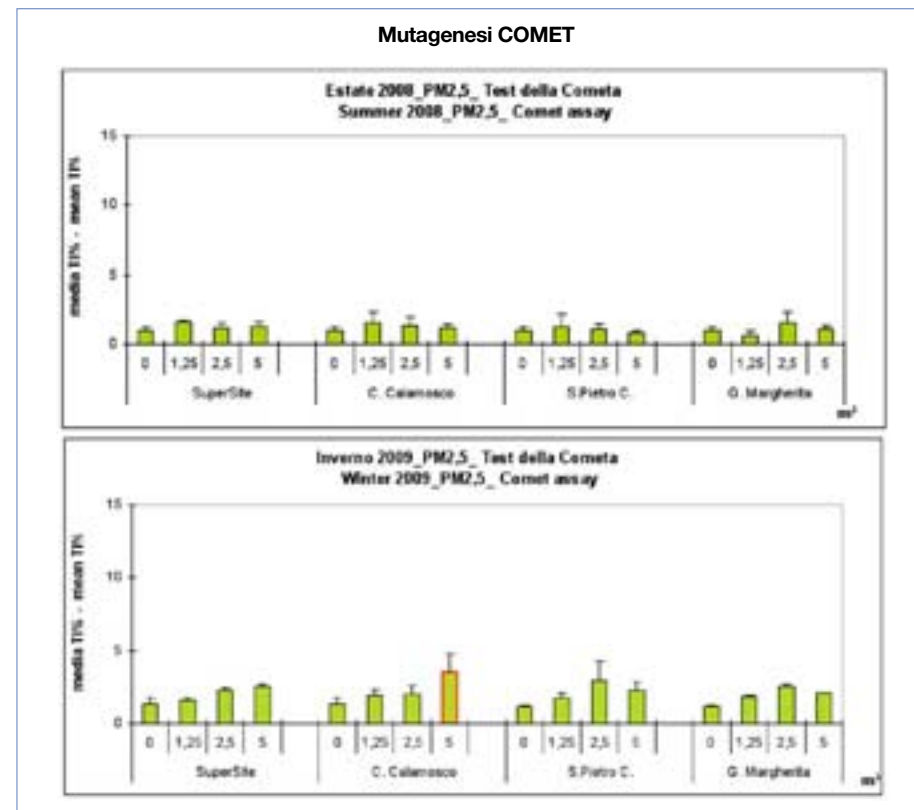


Fig.5 Comparazione degli effetti mutageni dei campioni invernali

I risultati ottenuti nel test della Cometa (fig 6) confermano sostanzialmente i dati ottenuti nel test di Ames, con i campioni estivi tutti negativi e con il campione Calamosco invernale unico positivo nel test.

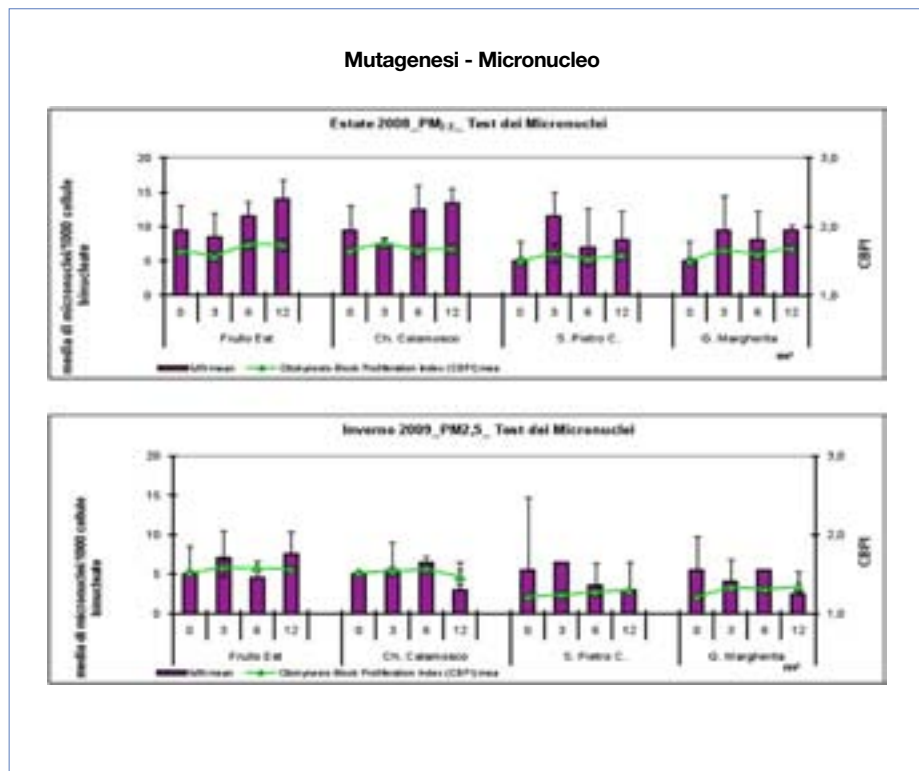
Tutti i campioni di PM2.5 prelevati in estate 2008 e in inverno 2009 non hanno indotto micronuclei in linfociti umani (fig. 7). L'indice di vitalità (CBPI) alle varie dosi non ha dimostrato variazioni, evidenziando la mancanza di attività tossica.



Corrispondenza peso particolato/volume trattamento

SITO	Estate 2008		Inverno 2009	
	m ³	µg	m ³	µg
Supersite	1,25	29,17	1,25	44,27
	2,5	58,33	2,5	88,54
	5,0	116,66	5,0	177,09
Chiesa Calamosco	1,25	26,38	1,25	43,09
	2,5	52,77	2,5	86,19
	5,0	105,53	5,0	172,37
S. Pietro Capofiume	1,25	17,37	1,25	41,71
	2,5	34,73	2,5	83,42
	5,0	69,46	5,0	166,83
Giardini Margherita	1,25	23,43	1,25	39,95
	2,5	46,86	2,5	73,91
	5,0	93,70	5,0	147,81

Fig.6 Studio comparativo dell'attività mutagenica (Test della Cometa) di particolato raccolto nei quattro siti prescelti. Leucociti di donatori sani (10⁶ leucociti/piastra) sono stati incubati con concentrazioni scalari (1.25, 2.5, 5 m³) di estratto per 1 h. Il DNA da cellule lisate, sottoposto a corsa elettroforetica su vetrino e marcato con bromuro di etidio viene osservato in fluorescenza. Il valore quantitativo del danno è dato dal coefficiente angolare delle rette di regressione dose-effetto dei campioni positivi e di quelli che presentano, comunque, un R² ≥ 0,60. La significatività viene calcolata rispetto al controllo non trattato tramite test della mediana. Supersite = Frullo Est



Corrispondenza peso particolato/volume trattamento

SITO	Estate 2008		Inverno 2009	
	m ³	µg	m ³	µg
Supersite	3	70,00	3	106,25
	6	139,99	6	212,51
	12	279,98	12	425,01
Chiesa Calamosco	3	63,32	3	103,42
	6	126,63	6	206,84
	12	253,26	12	413,68
S. Pietro Capofiume	3	41,68	3	100,10
	6	83,35	6	200,20
	12	166,70	12	400,39
Giardini Margherita	3	56,22	3	88,69
	6	112,45	6	177,38
	12	224,89	12	354,75

Fig.7 Studio comparativo dell'attività mutagenica (test del micronucleo) di particolato raccolto nei quattro siti prescelti. Linfociti di donatori sani (10⁵ leucociti/piastra) sono stati incubati con concentrazioni scalari (0, 3, 6, 12 m³) di estratto in due repliche indipendenti. Supersite = Frullo EST

I test di mutagenesi sono stati condotti anche su campioni di terreni naturali, prelevati negli stessi siti di prelievo dei campioni d'aria, e su terreni artificiali preparati in laboratorio e disposti negli stessi siti. Dai dati derivanti da tutti i test effettuati, tutti i campioni di suolo naturale, in entrambe le stagioni sono risultati positivi senza mostrare una più elevata mutagenicità a carico del campione Frullo Est. I suoli artificiali sono risultati generalmente negativi (dati riportati nella relazione finale di azione).

Cancerogenesi in vitro

Nel test di citotossicità gli estratti organici di particolato urbano raccolto sia nella stagione invernale che in quella estiva hanno indotto significativi effetti citotossici sulle cellule BALB/c 3T3 A31-1-1 (fig. 8).

Tutte le dosi di estratto saggiato (1-2-6-12 m³) hanno determinato una riduzione significativa del numero medio di colonie/piastra nelle cellule BALB/c 3T3 A31-1-1, indipendentemente dal sito di provenienza.

Tuttavia, tutti i campioni raccolti nella stagione estiva sono risultati negativi nel test di trasformazione, predittivo per la cancerogenicità. Nello stesso test, i campioni raccolti nel sito di Calamosco e nel sito rurale di S. Pietro Capofiume sono invece in grado di indurre un significativo incremento della trasformazione cellulare alla dose più alta saggiata (fig 9).

Corrispondenza metri cubi e milligrammi di particolato utilizzato nell'esperimento relativa alle Figure 8 e 9

SITO	Estate 2008		Inverno 2009	
	m ³	µg	m ³	µg
Frullo Est	1	23,33	1	35,42
	2	46,66	2	70,83
	6	139,99	6	212,50
	12	280	12	425,01
Calamosco	1	21,11	1	34,47
	2	42,21	2	68,95
	6	126,63	6	206,84
	12	253,27	12	413,68
Giardini Margherita	1	18,74	1	29,56
	2	37,48	2	59,12
	6	112,45	6	177,37
	12	224,89	12	354,75
S. Pietro Capofiume	1	13,89	1	33,37
	2	27,78	2	66,73
	6	83,35	6	200,19
	12	166,70	12	400,39

Tossicità - Modello BALB/c 3T3

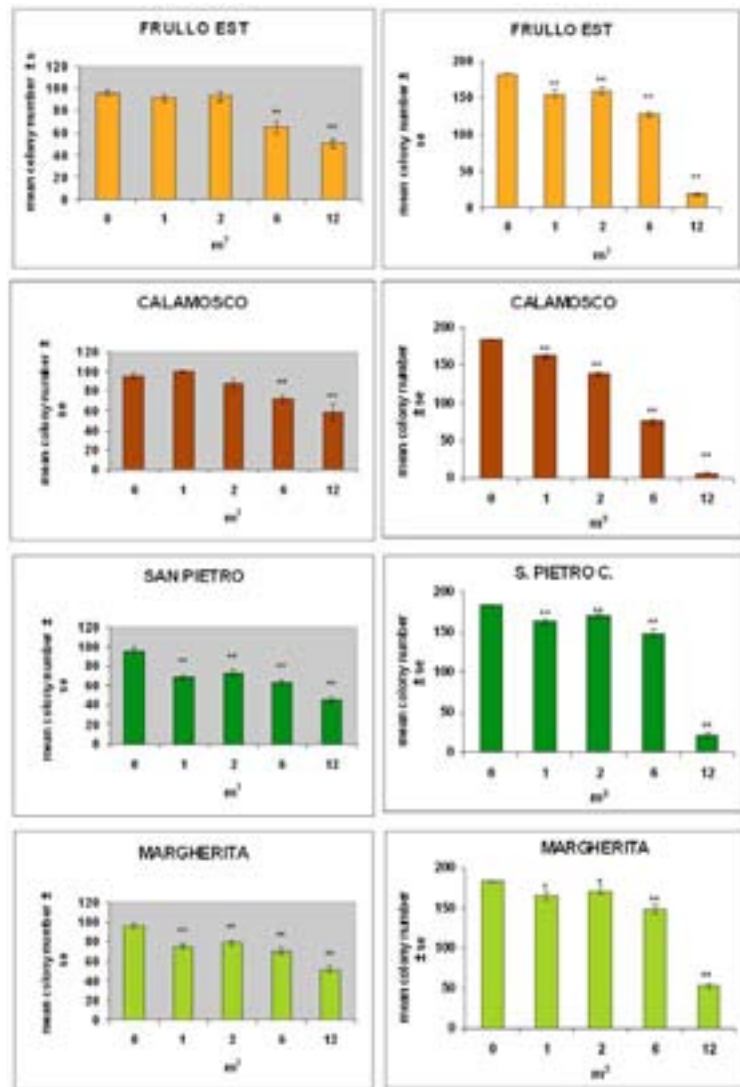


Fig.8 Effetti citotossici misurati in cellule BALB/c 3T3 dopo esposizione a particolato raccolto nei quattro siti prescelti. Le cellule (250 cellule/piastra) sono state incubate per 48 ore con concentrazioni scalari di estratto. I dati sono riportati come numero di colonie per piastra e sono una media (±ES) di 5 repliche. Significatività statistica: * p<0.05, vs controllo solvente, Student t test; ** p<0.01, vs controllo solvente, Student t test.

Trasformazione - Modello BALB/c 3T3

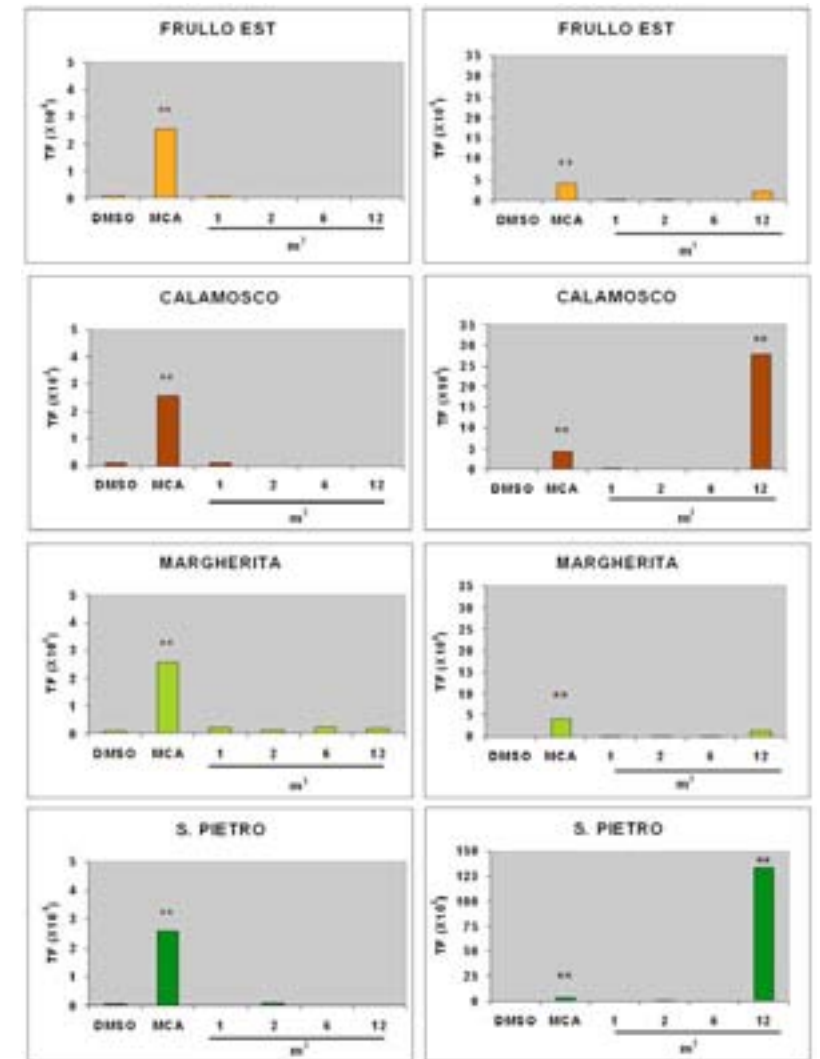


Fig.9 Frequenza di trasformazione in cellule BALB/c 3T3 dopo esposizione a particolato raccolto nei quattro siti prescelti. Le cellule (30.000 cellule/piastra) sono state incubate per 48 ore con concentrazioni scalari di estratto. I dati sono riportati come Trasformation frequency (TF) un indice ricavato dal numero di foci maligni di origine monoclonale riscontrato in ogni trattamento per il numero delle cellule a rischio (cellule sopravvissute all'effetto tossico acuto dell'estratto). Significatività statistica: ** p<0.01, vs controllo solvente, Poisson rates comparison. MCA = 3-metilcolantrene, utilizzato come controllo positivo (cancerogeno) alla concentrazione di 2.5 µg/ml/piastra

In conclusione, in tutti gli endpoint biologici saggiati non si evidenziano differenze significative tra il profilo tossicologico tracciato per il sito di Frullo EST e quello del suo controllo Calamosco. Quest'ultimo, anzi, in molti test (rilascio Il1-beta, campione estivo, Ames campione invernale, Comet campione invernale, citotossicità e trasformazione nel modello BALB/c 3T3, campione invernale) è risultato il campione più efficiente nell'indurre effetti rilevabili.

Al di fuori della problematica relativa alle conseguenze della presenza dell'inquinatore, i test eseguiti evidenziano, comunque, un inquinamento generalizzato che coinvolge anche i siti teoricamente più "puliti" come San Pietro e Giardini Margherita. Il particolato in generale ha attività infiammatoria e anche pro-infiammatoria, come dimostrato in un esperimento condotto ad hoc in Azione 1 su particolato di origine urbana (PM10) e su un pool di PM2.5 prelevato durante le campagne di Monitor. La maggiore mutagenicità, nel test di Ames, dei campioni prelevati in inverno, conferma le osservazioni effettuate nel corso degli anni che hanno sempre evidenziato forti differenze stagionali.

Profilo tossicologico da endpoint biomolecolari

La tossicogenomica studia in quale modo il genoma di un organismo risponde ai fattori ambientali di stress e agli inquinanti. La tossicogenomica combina la tossicologia con la genomica per comprendere il ruolo delle interazioni gene-ambiente nella insorgenza dei disturbi e delle patologie legate a specifiche esposizioni.

Una delle tecniche di tossicogenomica maggiormente impiegata per lo studio delle esposizioni ambientali è la trascrittomiche mediante l'utilizzo della tecnica di DNA microarray. Con questa tecnica è possibile riconoscere la variazione di espressione di migliaia di geni (l'intero genoma che, a seconda dell'organismo va da qualche migliaio di geni a decine di migliaia) in cellule che siano state esposte a singoli composti, chimici, miscele complesse di composti o, come nel caso di questo studio, a estratti di matrici ambientali. Con questo approccio è anche possibile ottenere elementi utili per identificare il modo d'azione o il meccanismo d'azione di composti chimici. Ogni esposizione determina uno specifico profilo trascrittomico, cioè modifica l'espressione di determinati geni. In questo progetto, è stata valutata l'espressione genica di tre diverse linee cellulari umane (T47D, HuMI, A549) e di una murina (BALB/c 3T3) in risposta

al trattamento con estratti di PM2.5 campionati nei siti Frullo Est, Calamosco e G. Margherita, sia durante la stagione estiva che invernale.

Per tutti i campioni è stata scelta una unica dose di trattamento pari a 8 m³ ricavata da un preliminare test di citotossicità su tutte le linee cellulari prescelte e condotto con il campione Calamosco inverno, risultato più tossico negli esperimenti precedentemente descritti.

Tab.5 Corrispondenza metri cubi e microgrammi di particolato utilizzato negli esperimenti di tossicogenomica

SITO	Estate 2008		Inverno 2009	
	m ³	µg	m ³	µg
Frullo Est	8	62,22	8	94,44
Calamosco	8	56,28	8	91,33
Giardini Margherita	8	49,98	8	78,83

La scelta del tempo di trattamento (4 ore) si è invece basata su dati di letteratura che dimostrano come dopo 4-6 ore di esposizione a miscele ambientali complesse si può, in molti sistemi cellulari, misurare una risposta trascrittomiche consistente e rappresentativa della risposta acuta della cellula all'insulto tossico. Le procedure di estrazione dell'RNA e di ibridazione sono riportate in dettaglio nella relazione finale di Azione 4.

Qui di seguito verranno date alcune informazioni di base per orientare la lettura dei risultati, rimandando per gli opportuni approfondimenti alla relativa relazione.

Modello cellulare T47D

Questa linea cellulare (insieme alla linea Humi) fornisce un modello d'organo rappresentativo della mammella. In particolare, le cellule T47D hanno recettori per estrogeni, androgeni, prolattina, calcitonina, oltre al recettore aril-idrocarburo, offrendo, dunque, la possibilità di studiare miscele contenenti interferenti o perturbatori endocrini. In effetti, la linea T47D si è dimostrata particolarmente informativa. Per questa ragione i risultati relativi a questo modello saranno trattati con maggiore enfasi.

L'analisi statistica per verificare la significatività degli scostamenti dell'espressione genica nelle cellule esposte rispetto alle cellule non esposte è consistita in due test statistici. L'analisi di tutti i campioni è stata effettuata con 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 "misurare" e confrontare la sensibilità delle linee cellulari ai trattamenti con PM. Il profilo di espressione dei geni identificati tramite ANOVA ($p < 0.01$, Bonferroni) è stato utilizzato per ricavare, tramite Principal Component Analysis (PCA), le componenti principali che meglio descrivono i trattamenti. Questa analisi viene utilizzata quando si hanno a disposizione un numero elevato di variabili e si suppone che l'informazione relativa a queste variabili sia ridondante. Applicando l'analisi si riduce il numero di variabili, accorpando quelle che forniscono lo stesso tipo di informazione, fino ad avere due o tre componenti tra loro ortogonali. È un'analisi molto utile per visualizzare i risultati di un'analisi complessa, come quella ricavabile da esperimenti di microarray (in cui il numero di osservazioni per trattamento è numeroso quanto il numero di geni differenzialmente espressi) in uno spazio a tre o due dimensioni in modo da visualizzare le somiglianze e le differenze tra i vari campioni (fig. 10). In questa analisi si identifica una componente principale, che include la massima variabilità dei dati e una seconda componente, ortogonale alla prima con il resto dell'informazione. In questo modo si disegna uno spazio a due dimensioni (nel nostro caso) in cui i dati sono confrontati come raggruppamenti di variabili simili. Nella figura 10 i geni modulati sono raggruppati in base a due variabili: il sito dove è stato prelevato il campione e la stagione di campionamento.

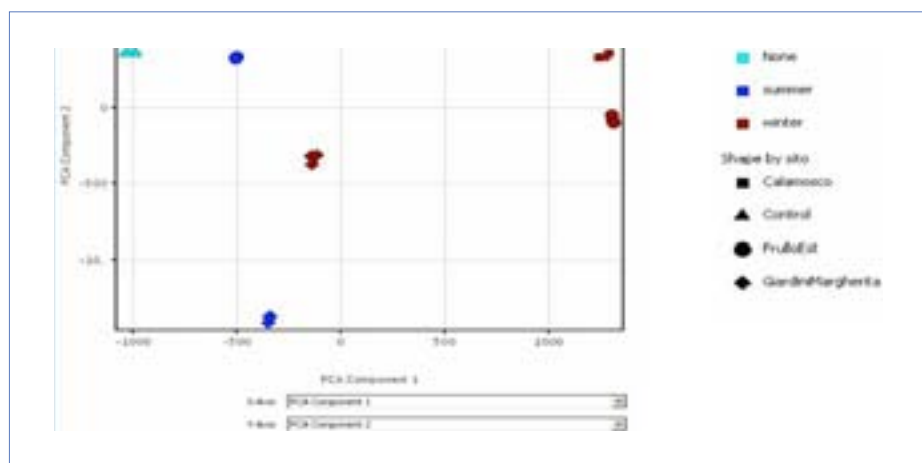


Fig 10. Analisi delle componenti principali (PCA) in cellule T47D esposte agli estratti di particolato raccolto in tre siti prescelti. I dati sono il risultato di tre repliche biologiche. Il controllo è rappresentato da cellule non trattate

La risposta trascrizionale nella T47D è fortemente dipendente dalla stagione, soprattutto in Calamosco e FrulloEst. I due siti infatti tendono a raggrupparsi insieme, a seconda della stagione, mostrando un comportamento molto simile (fig. 10). Inoltre, i profili trascrizionali di Calamosco e FrulloEst nella stagione invernale sono, nel confronto con Giardini Margherita, decisamente più distanti e differenti dal controllo solvente.

Nella "two-sample analysis" è stato invece effettuato un confronto a coppie degli estratti Frullo Est vs G.Margherita, Calamosco vs G. Margherita e Frullo Est vs Calamosco approfondendo poi nei dettagli il significato biologico delle modulazioni trascrizionali. Questo confronto tra i trattamenti è stato effettuato con un t-test e confermato con LIMMA (Linear Models for Microarray Analysis) un altro approccio statistico specificamente disegnato per esperimenti di microarray.

Tenendo presente il marcato effetto della stagione nella risposta trascrizionale delle T47D si è deciso di mettere a confronto i trattamenti separando la stagione invernale da quella estiva.

In fig. 11 è riportato il numero di geni differenzialmente espressi per ogni confronto. L'analisi è stata effettuata con il t-test. Limma ha dato risultati sostanzialmente simili.

T47D (T-test, FDR<0.01, fold-change >1.2)						
	Inverno			Estate		
	Total	Up	Down	Total	Up	Down
Frullo EST vs G. Margherita	5329	2623	2706	6019	3069	2950
Calamosco vs G. Margherita	4850	2359	2491	6591	3628	2963
Frullo EST vs Calamosco	1261	541	720	358	180	178

Fig 11. Numero di geni differenzialmente espressi sulla base del T-test (FDR<0.01) e con un valore assoluto di fold-change maggiore di 1.2 nella linea T47D. FDR = false discovery rate, proporzione attesa di falsi positivi

Per l'interpretazione biologica dei dati, cioè per identificare il ruolo dei geni che risultano diversamente espressi nelle cellule esposte rispetto alle cellule non esposte, sono stati utilizzati due strumenti: Pathway Express (PE) e Gene Set Enrichment Analysis (GSEA). Per i dettagli metodologici si rimanda alla relazione finale.

Il quadro restituito dall'analisi PE nei campioni invernali non mostra differenze significative rispetto alle funzioni biologiche influenzate dall'esposizione ai campioni testati. Frullo Est e Calamosco differiscono tra loro per un numero esiguo di geni, mostrando, anche in questo approccio biomolecolare, che i campioni d'aria raccolti in questi due siti hanno un profilo tossicologico sostanzialmente simile e differiscono in egual misura dal profilo identificato per il campione Giardini Margherita (dati riportati nella relazione finale dell'Azione 4). La Gene Set Enrichment Analysis GSEA applicata agli stessi confronti tra siti ha permesso di confermare e ampliare queste osservazioni. Si evince che i campioni Frullo e Calamosco sono molto simili e entrambi differiscono da Giardini Margherita.

I risultati danno evidenza che la gran parte dei processi modulati sia in Frullo-Est che in Calamosco si raggruppano nei seguenti percorsi biologici:

- Attivazione del sistema immunitario e della risposta infiammatoria
- Regolazione della coagulazione ed emostasi
- Modulazione di processi di regolazione della crescita cellulare.

Tra i processi biologici identificati dalla analisi GSEA come significativamente arricchiti in Frullo e Calamosco rispetto a G.Margherita ritroviamo anche Female Pregnancy. Questo processo biologico raggruppa i trascritti che sono coinvolti nelle varie fasi della gravidanza. Poiché molta recente letteratura riporta una relazione fra inquinamento ambientale, soprattutto relativo alla matrice aria e alle componenti inquinanti derivanti dal traffico veicolare, e effetti sulla funzione riproduttiva, si è deciso di approfondire questo specifico Gene Set, identificando i geni che determinano l'arricchimento positivo nei differenti confronti (fig 12).

Female pregnancy analysis	Enrichment score: 1.9 FDR: 0.04 (p-value<0.01)	Enrichment score: 1.67 FDR: 0.17 (p-value<0.01)	Enrichment score: 1.62 FDR: 1 (p-value<0.01)
Gene description	Frullo vs Margherita	Calamosco vs Margherita	Frullo vs Calamosco
angiotensinogen	AGT	AGT	HPGD
corticotrophin releasing hormone	CRH	CSH2	CRH
tachykinin 3 (neuromedin K, neurokinin beta)	TAC3	TAC3	PSG7
hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15- (NAD)	HPGD	PPARD	PSG5
collagen, type XVI, alpha 1	COL16A1	CRH	PSG4
pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 5 precursor	PSG5	SPRR2D	COL16A1
pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 7	PSG7	COL16A1	AGT
pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 9	PSG	PRLHR	PSG11
ghrelin/obestatin preprohormone	GHRL	ADM	PSG8
chorionic somatomammotropin hormone 2	CSH2		TAC3
adrenomedulin	ADM		SCGB1A1
Fc fragment of IgG, receptor, transporter, alpha	FCGRT		PSG6
transcription factor CP2-like 1	TFCP2L1		PSG1
pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 8	PSG8		PSG9
pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 1	PSG1		SPRR2C
secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin)	SCGB1A1		GHRL
pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 6	PSG6		GHSR
pregnancy-specific beta-1-glycoprotein 11	PSG11		
growth hormone secretagogue receptor	GHSR		
small praline-rich protein 2D	SPRR2D		

Fig 12. Lista dei geni che contribuiscono alla formazione di un fattore di arricchimento positivo (enrichment core genes) per il processo biologico Female Pregnancy nella GSEA.

Dall'elenco riportato si evidenzia che il confronto fra Frullo e Giardini è caratterizzato da un valore di arricchimento più alto. L'arricchimento del confronto Frullo vs Calamosco non è significativo secondo i criteri imposti in questo studio (FDR = 1). Una simile attenzione è stata posta anche al processo biologico "Coagulation", individuando i geni più importanti riportati in fig. 13.

"Coagulation" analysis	Enrichment score: 2.10 FDR: 0.012	Enrichment score: 1.54 FDR: 0.11	Enrichment score: 1.20 FDR: 0.75
Gene description	Frullo vs Margherita	Calamosco vs Margherita	Frullo vs Calamosco
plasminogen activator, tissue (PLAT)	PLAT	PLAT	GNAQ
tissue factor pathway inhibitor	TFPI	F7	PLAT
platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)	PF4	TFPI	KNG1
coagulation factor VII	F7	GNAQ	F2
coagulation factor XII	F12	PF4	LMAN1
integrin, alpha 2	ITGA2	F2	THBD
coagulation factor II	F2	LMAN1	F7
protein S (alpha) (PROS1)	PROS1	F5	
plasminogen (PLG)	PLG	PLG	
Wiskott-Aldrich syndrome	WAS	F12	
von Willebrand factor (VWF)	VWF	WAS	
		C4BPB	
		TMPRSS6	

Fig 13. Lista dei geni che contribuiscono alla formazione di un fattore di arricchimento positivo (enrichment core genes) per il processo biologico Coagulation nella GSEA.

I risultati ottenuti nel modello T47D in risposta al trattamento con estratti invernali di particolato evidenziano che, in presenza di un bersaglio cellulare idoneo, l'esposizione a una qualche componente presente negli estratti attiva circuiti trascrizionali che convergono su geni coinvolti nella gravidanza e parto. Per le molecole ad attività ormono-simile, anche piccole modulazioni a livello trascrizionale possono produrre significativi affetti a livello fisiologico. Questo dato meriterebbe perciò ulteriori indagini sia per la conferma del dato in quanto tale (sulle T47D e sugli stessi estratti) sia per capire quanto sia generalizzabile e fisiologicamente rilevante nell'organismo umano.

I dati microarray relativi alla linea T47D trattata con gli estratti estivi sono stati analizzati con lo stesso approccio seguito per i dati della campagna invernale. Molti dei processi biologici evidenziati nell'analisi della campagna invernale ritornano anche nella campagna estiva, con la differenza sostanziale che il pathway Female Pregnancy non risulta coinvolto, suggerendo che le componenti inquinanti che lo attivano siano presenti solo nella stagione invernale

Gli altri modelli cellulari

La linea di mammella HuMI ha risentito del forte effetto citotossico degli estratti in esame, che ha determinato uno spegnimento a carico di molti geni, tanto da non risultare particolarmente informativa. Infatti, già dopo solo 4 ore di trattamento con la dose 8 m³ l'effetto trascrizionale prevalente nella popolazione cellulare trattata è quello di un massiccio arresto della proliferazione dovuta all'insulto tossico.

Tuttavia, in via generale la risposta nelle HuMI è abbastanza simile a quella che si osserva nella linea pneumocitaria A549, dove la citotossicità indotta dagli estratti è stata più modesta, e l'inibizione trascrizionale ha riguardato solo certi processi biologici relativi alla migrazione leucocitaria nei tessuti e ai sistemi di adesione tra cellule.

Nella linea murina BALB/c 3T3, è stato evidenziato un maggior effetto tossico da parte di Calamosco, con una attivazione anche dei marcatori di morte cellulare per apoptosi.

In conclusione, nonostante le differenze linea-dipendenti, gli estratti Frullo Est e Calamosco hanno un comportamento sempre piuttosto simile, che li differenzia da Giardini Margherita, con effetti più marcati a carico di Calamosco. Si può, dunque, concludere dai dati ottenuti in tutte le linee cellulari testate, che gli effetti osservati non sono diversi per Frullo rispetto al suo controllo Calamosco, suggerendo che non vi siano effetti direttamente e solamente ascrivibili all'attività dell'inceneritore.

Predizione del rischio cancerogeno da esposizione

Il maggior contributo al raggiungimento di questo obiettivo è stato fornito dall'Azione 5, nell'ambito della quale è stata condotta un'analisi di tutti i dati ottenuti dalla caratterizzazione chimica dei campionamenti effettuati nelle due campagne, estesa, dove possibile, a tutti i siti considerati nel progetto Monitor e precisamente:

- Frullo Est e Frullo Ovest, siti di massima ricaduta,
- Calamosco e F19, siti di minimo impatto dell'inceneritore
- Giardini Margherita, fondo urbano
- Veduro, fondo rurale
- Pianeta, massima influenza di tutte le fonti

L'analisi è stata condotta per i campioni PM2.5 e PM1

I microinquinanti considerati sono stati:

- Idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e NitroIPA
- Diossine, furani e policlorurati bifenili (PCB) diossino-simili

Si tratta di miscele complesse, la cui composizione è difficile da definire completamente. Ai fini del calcolo del rischio, così come per fini normativi, ci si riferisce al composto più pericoloso di ogni classe considerata, per gli IPA e Nitro-IPA è rappresentato dal benzo(a)pirene, (B(a)P) cancerogeno, mentre per le diossine, furani e PCB è rappresentato dalla tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD), classificata come cancerogena in US-EPA e IARC. La stima di rischio è stata effettuata per ogni contaminante misurato trasformato in B(a)P equivalenti o TCDD equivalenti e per la somma di tutti i contaminanti misurati in ogni sito. Per i dettagli metodologici si rimanda alla relazione dell'Azione 5. Qui si ricorda che si considera comunemente che non ci sia un incremento di rischio di cancro dovuto a una esposizione quando il valore rilevato sia uguale o inferiore a 1×10^{-6} , valore che indica la probabilità che si verifichi un caso di tumore ogni milione di soggetti esposti

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

1. IPA e NitroIPA sono stati considerati come totale di IPA oppure somma di quegli IPA e NitroIPA con un fattore di potenza cancerogena superiore al valore del composto di riferimento Benzo(a)pirene (B(a)P) e dei trasformati in BaP equivalenti). La concentrazione di questi composti, di PCB (totale, dioxin-like e non dioxin-like), di diossine e di furani nei campioni prelevati nei siti di massima ricaduta (Frullo est e Frullo ovest) non è risultata superiore rispetto ai campionamenti effettuati presso i siti di minima ricaduta (Calamosco e F19, che costituiscono i rispettivi controlli) in entrambe le campagne di monitoraggio (estiva 2008 e invernale 2009). 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.

2. Confrontando le misurazioni di IPA e NIPA effettuate nelle due campagne di monitoraggio si osserva un (atteso) aumento nella concentrazione di tali

contaminanti di circa un ordine di grandezza durante la stagione invernale 2009, analogamente ai valori trasformati in B(a)P equivalenti. I livelli di PCB, invece, risultano simili e paragonabili nei due differenti periodi di campionamento. Per quanto riguarda le concentrazioni di diossine e furani si osserva un aumento significativo nella campagna invernale rispetto a quella estiva ma, in seguito alla trasformazione del dato in tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD) equivalenti, valore più predittivo per gli effetti tossici, tale significatività viene persa. Di nuovo non si osservano nei siti di massima ricaduta (Frullo est e Frullo ovest) valori superiori ai siti dei controlli (rispettivamente Calamosco e F19).

3. 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/mc) presente nel riferimento normativo (D.Lgs 152/07). 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 e quelle relative alla campagna invernale sono inferiori di circa 1 ordine di grandezza al limite di legge. Se si considera l'esposizione al solo B(a)P la stima di rischio cancerogeno resta sempre almeno un ordine di grandezza al di sotto del valore comunemente considerato quale espressione di assenza di eccesso di rischio (1×10^{-6}) (fig. 14A). La somma di IPA e NitroIPA, trasformati in B(a)P equivalenti porta a una stima di rischio di 1×10^{-4} nella stagione invernale (fig. 14B), senza differenze fra il sito dell'inceneritore e del suo controllo. Per quanto riguarda gli IPA, rileviamo dunque che un rischio di eccesso di tumori esiste, anche se non direttamente dipendente dall'attività dell'inceneritore, ma si rende evidente solo quando si sommano le concentrazioni di tutti gli inquinanti presenti nella miscela (fig 14B).

4. La stima del rischio cancerogeno relativa al valore trasformato in TCDD equivalenti non mostra differenze nelle due campagne (estiva ed invernale). La stima del rischio tumorale è sempre inferiore a 1 su 1 milione (considerato assenza di eccesso di rischio), anche quando si sommano le concentrazioni di tutti gli inquinanti misurati (fig 15). Non si evidenziano differenze significative tra il Frullo e il suo controllo (Calamosco), la cui stima

anzi risulta leggermente superiore, Si rimarca che si tratta di miscele complesse, comprendenti, oltre alla diossina TCDD, altri composti policlorurati diossino-simili e che le stime di rischio non possono tener conto delle possibili interazioni. Tuttavia la stima effettuata sommando tutti i composti con meccanismo d'azione simile dovrebbe rendere conto del possibile effetto additivo.

Rischio di cancro (A)		
PM _{2.5}	Estate	Inverno
	B(a)P	B(a)P
Frullo est	1.10 x10 ⁻⁸	3.99 x10 ⁻⁷
Calamosco	1.43 x10 ⁻⁸	10.22 x10 ⁻⁷
Frullo ovest	1.21 x10 ⁻⁸	1.94 x10 ⁻⁷
F19	1.98 x10 ⁻⁸	3.72 x10 ⁻⁷
Castenaso	1.32 x10 ⁻⁸	3.31 x10 ⁻⁷
Margherita	0.99 x10 ⁻⁸	2.96 x10 ⁻⁷
Pianeta	1.76 x10 ⁻⁸	2.09 x10 ⁻⁷
Veduro	0.44 x10 ⁻⁸	4.42 x10 ⁻⁷

Rischio di cancro (B)		
PM _{2.5}	Estate	Inverno
	B(a)P eq.	B(a)P eq.
Frullo est	0.93 x10 ⁻⁵	1.04 x10 ⁻⁴
Calamosco	0.58 x10 ⁻⁵	2.15 x10 ⁻⁴
Frullo ovest	0.75 x10 ⁻⁵	0.64 x10 ⁻⁴
F19	1.04 x10 ⁻⁵	0.88 x10 ⁻⁴
Castenaso	0.61 x10 ⁻⁵	0.85 x10 ⁻⁴
Margherita	0.51 x10 ⁻⁵	0.65 x10 ⁻⁴
Pianeta	0.61 x10 ⁻⁵	1.35 x10 ⁻⁴
Veduro	0.42 x10 ⁻⁵	1.17 x10 ⁻⁴

Fig 14. Valori di rischio cancerogeno in relazione all'inalazione cronica (per tutta la vita) del solo B(a)P (A) o della somma di tutti gli IPA e NitroIPA, espressi in benzo(a)pirene-equivalenti (B) in relazione alla concentrazione rilevata nei vari siti.

Rischio di cancro				
PM _{2.5}	Estate	Inverno	Estate	Inverno
	PCB totali		CDD+PCDF+DL-PCB TCDD eq.	
Frullo est	4.27 x10 ⁻⁸	6.05 x10 ⁻⁸	6.59 x10 ⁻⁷	6.77 x10 ⁻⁷
Calamosco	3.59 x10 ⁻⁸	7.34 x10 ⁻⁸	6.54 x10 ⁻⁷	9.23 x10 ⁻⁷
Pianeta	4.20 x10 ⁻⁸	6.68 x10 ⁻⁸	5.99 x10 ⁻⁷	9.01 x10 ⁻⁷

Fig 15. Valori di rischio cancerogeno in relazione all'inalazione cronica (per tutta la vita) di PCB o della somma di tutte le diossine e composti diossino simili, espressi in tetracloodiossina equivalenti in relazione alla concentrazione nei vari siti.

5. I valori di rischio stimato sono compatibili con la negatività dei campioni analizzati nell'Azione 3 della LP 5 nel saggio di trasformazione in vitro con il modello cellulare BALB/c 3T3 A31-1-1 la cui sensibilità è dell'ordine di 1 su 10.000. Relativamente all'approccio alle diossine (TCDD-equivalenti) tramite TDI (tolerable daily intake), la dose derivante dall'inalazione è in tutti i casi simile e inferiore al TDI di più di 2 ordini di grandezza. In altri termini, valori così bassi di diossine inalate non costituiscono un problema sanitario.

In conclusione, non si registra con l'analisi effettuata un eccesso di rischio imputabile all'impianto di incenerimento considerato.

Considerazioni generali e raccomandazioni

I risultati ottenuti nella LP 5 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 (Frullo Est) e nel sito appartenente allo stesso dominio, ma non interessato dalla ricaduta dei fumi dell'impianto (Calamosco). Molti indici, anzi, imputano al sito Calamosco un'attività tossicologica più elevata. Anche l'analisi dei microinquinanti rilevati in tutti i siti dove è stata eseguita la raccolta dei campioni e la caratterizzazione chimica del particolato non mostra situazioni preoccupanti legate alla predizione di un eccesso di rischio di tumori imputabili all'attività dell'impianto di incenerimento. Potremmo, dunque, concludere che al quesito principale, alla base del disegno dello studio della LP 5 e relativo alla valutazione di rischi futuri per la sa-

lute umana della popolazione attualmente residente nelle aree interessate da inceneritori, si può rispondere che l'inceneritore, dai risultati di questo studio, non incrementa il rischio di tumori.

Va, tuttavia, considerato che l'impianto di incenerimento oggetto dello studio (Frullo) è un impianto relativamente nuovo (entrato in funzione nel 2005, in sostituzione del vecchio impianto), sottoposto, come tutti gli impianti in esercizio, a un monitoraggio permanente. Sul Frullo inoltre il monitoraggio si estende anche all'aspetto tossicologico. Se da un canto questo aspetto indica un modello da seguire per minimizzare l'impatto ambientale degli inceneritori, dall'altro rende palese che questi risultati non possono essere generalizzati a impianti più vecchi e più impattanti, ma si prestano a una inferenza su impianti con le stesse caratteristiche di quello studiato.

Preme, comunque, sottolineare alcuni aspetti di innovazione che questa linea di ricerca offre.

L'approccio integrato dell'analisi tossicologica con un endpoint di infiammazione, tre endpoints, a complessità crescente, di mutagenesi, un endpoint di cancerogenesi in vitro ben si inserisce nella pressante richiesta da parte della Unione Europea di sviluppo di test alternativi per la predizione del rischio e offre un modello spendibile in più matrici e situazioni ambientali. L'elevata ripetibilità dei test, corredata da serie storiche, patrimonio dei singoli laboratori partecipanti, rende possibile, anche in futuro, indagare e comparare altre fonti e altre componenti. In Azione 1, fra l'altro, è stato messo a punto un biosensore che costituirà un altro sensibile e specifico strumento per misurare gli stadi più precoci della risposta infiammatoria all'insulto ambientale.

L'analisi tossicogenomica, già ampiamente considerata sia nella letteratura scientifica che nella normativa europea vigente (es Reg CE 1907/2006 (REACH), Reg CE 1223/2009 (Cosmetici)) quale strumento innovativo e potente per la predizione del rischio di composti chimici, già applicata da altri ricercatori in studi relativi all'inquinamento generalizzato dell'aria, ha dimostrato, anche in questo studio, di essere uno strumento versatile, in grado di discriminare fra più fonti, di individuare marcatori di esposizione e di predizione del rischio e di consentire una lettura a più moduli dei risultati. È stato inatteso, ma non sorprendente, che i risultati ottenuti nel modello mammario più sensibile, con recettori per sostanze ad attività ormonale o ormono-simile, portino l'attenzione su possibili effetti sulla fisiologia del parto di inquinanti

presenti nell'aria, che tuttavia non sembra di potere attribuire alle emissioni dell'inceneritore.

La valutazione del rischio ha consentito una 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 (non solo quelli causati dall'inceneritore) della popolazione residente - l'indagine fin qui eseguita non può ritenersi completa ed esaustiva.

Manca, per esempio, un'analisi altrettanto 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 particolare modo i siti Frullo Est e Calamosco, e da includere nella procedura di valutazione del rischio. Una indagine futura non può prescindere da questa preziosa informazione per comprendere la reale entità degli effetti osservati negli studi di tossico genomica e 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), che risulta essere sempre molto informativa sulla risposta stadio-temporale della cellula.

Di tutto ciò si dovrebbe tenere conto nell'eventualità di studi successivi al progetto Monitor.

Riteniamo, comunque, che il lavoro svolto e i risultati raggiunti non soddisfino solo gli obiettivi della linea, ma anche l'assioma di partenza che poneva la condizione di utilizzare al meglio le tecnologie più avanzate e gli approcci più innovativi per indagare ciò che prima non era stato indagato.