

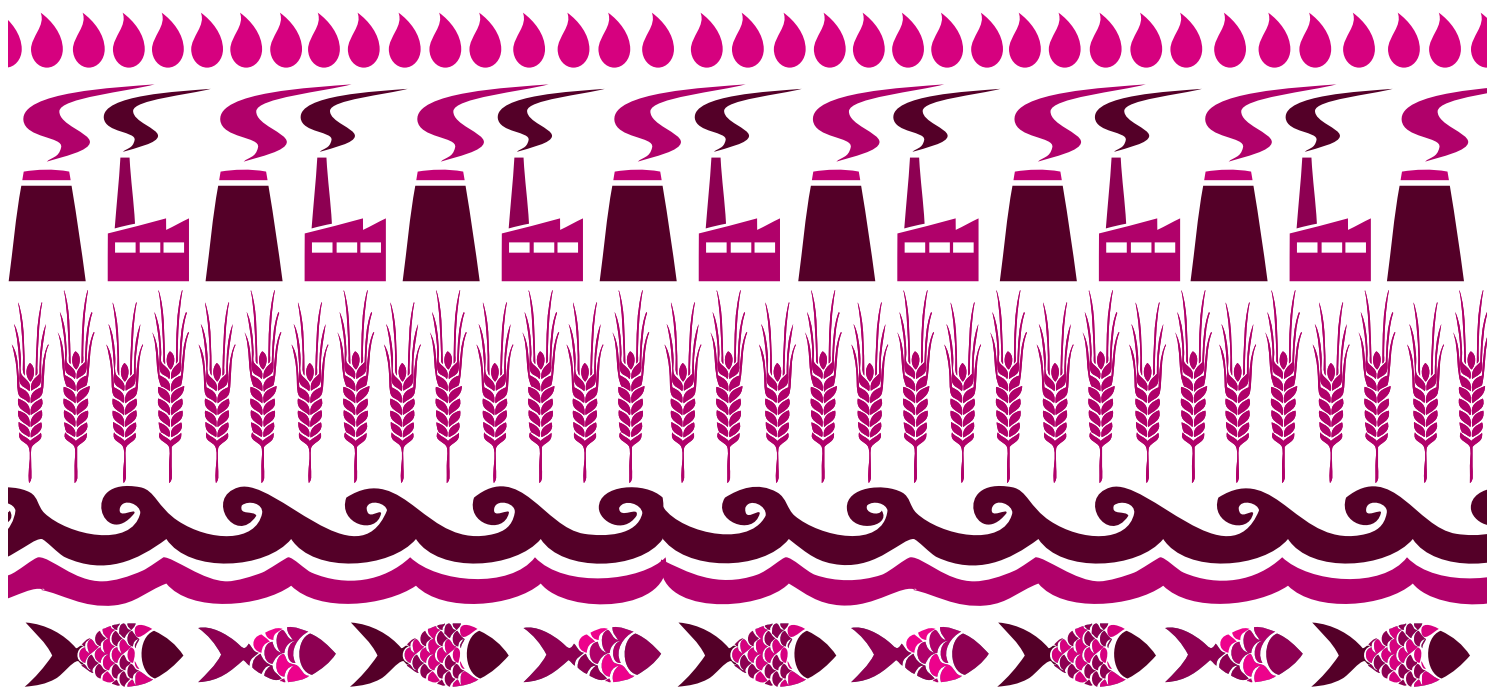
supplemento 1
numero **3/4** anno 38
maggio
agosto
2014

EPIDEMIOLOGIA & PREVENZIONE

Rivista dell'Associazione italiana di epidemiologia



A CURA DI: Elisa Bustaffa,
Fabrizio Minichilli, Fabrizio Bianchi



ISTITUTO DI FISIOLOGIA CLINICA
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE



Centro nazionale per la prevenzione
e il Controllo delle Malattie

STUDI SU MARCATORI DI ESPOSIZIONE ED EFFETTO PRECOCE IN AREE CON INQUINAMENTO DA ARSENICO: METODI E RISULTATI DEL PROGETTO SEPIAS*

STUDIES ON MARKERS OF EXPOSURE AND EARLY EFFECT IN AREAS
WITH ARSENIC POLLUTION: METHODS AND RESULTS OF THE PROJECT SEPIAS*

* PROGETTO CCM-2010 "SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA IN AREE
CON INQUINAMENTO AMBIENTALE DA ARSENICO DI ORIGINE NATURALE O ANTROPICA"

* PROJECT CCM-2010 "EPIDEMIOLOGIC SURVEILLANCE IN AREAS WITH ENVIRONMENTAL
POLLUTION BY ARSENIC OF NATURAL OR ANTHROPOGENIC ORIGIN"

EDIZIONI **i**nferenze



Rivista fondata da **Giulio A. Maccacaro**

Anno 38 (3-4) 2014

Epidemiologia & Prevenzione
è indicizzata in **Medline**,
Science Citation Index Expanded,
Journal Citation Reports/Science Edition

**Pubblicazione bimestrale Registrazione
del Tribunale di Milano**

n. 239/1977 Spedizione in AP - 45% - art. 2 comma 20b legge
662/96 - Milano.

**Iscrizione al Registro degli Operatori
di Comunicazione (ROC) n. 11747.**

Una copia: 13,50 euro.

Abbonamento annuo: informazioni e condizioni sul sito
www.epiprev.it

Gestione abbonamenti: ufficio abbonamenti
tel. 02 48702283, fax 02 48706089.

I dati necessari per l'invio della rivista sono trattati elettronicamente e utilizzati dall'editore Inferenze scrl per la spedizione della presente pubblicazione e di altro materiale medico-scientifico. Ai sensi dell'art.13 Legge 675/96 è possibile in qualsiasi momento e gratuitamente consultare, modificare e cancellare i dati, o semplicemente opporsi al loro utilizzo scrivendo a: Inferenze scrl, responsabile dati, via Ricciarelli 29, 20148 Milano.

IVA assolta dall'editore ai sensi dell'art. 74 lettera C del DPR 26/10/1972 n.633 e successive modificazioni e integrazioni nonché ai sensi del DM 29/12/1989. Non si rilasciano quindi fatture (art. 1 c. 5 DM 29/12/1989).

Testata associata

A.N.E.S.
ASSOCIAZIONE NAZIONALE
EDITORIA PERIODICA SPECIALIZZATA

Stampa

Arti grafiche Ancora srl - Milano

EPIDEMIOLOGIA & PREVENZIONE



via Ricciarelli 29, 20148 Milano
segreteria@inferenze.it

Direttore scientifico

Eugenio Paci

Vicedirettore scientifico

Francesco Forastiere

Past director

Benedetto Terracini

Direttrice responsabile

Maria Luisa Clementi

Segreteria scientifica

Liliana Cori

Redazione

Marco Crespi, Cinzia Tromba, Maria Cristina Porro

Segreteria di redazione

via Giusti 4, 21053 Castellanza (VA)

e-mail: epiprev@inferenze.it

Copertina

Elisabetta Mancini

Impaginazione

Giovanna Smiriglia

Comitato di direzione

Fabio Barbone, Annibale Biggeri, Dolores Catelan, Dario Consonni, Emanuele Crocetti, Marina Davoli, Paolo Giorgi Rossi, Chiara Marinacci, Andrea Ranzì, Lorenzo Richiardi, Antonia Stazi, Giuseppe Traversa.

Comitato editoriale

Alessandro Barchielli, Antonella Bena, Carla Bietta, Achille Cernigliaro, Fabrizio Faggiano, Emilio Gianicolo, Ursula Kirchmayer, Paola Michelozzi, Alessio Petrelli (AIE); Franco Berrino, Annibale Biggeri, Pietro Comba, Gemma Gatta, Luigi Mara, Alberto Martinelli, Enzo Merler, Franco Merletti, Salvatore Panico, Silvano Piffer (Coop. *Epidemiologia & Prevenzione Giulio A. Maccacaro*); Fabio Barbone, Pier Alberto Bertazzi, Fabrizio Bianchi, Piero Borgia, Silvia Candela, Franco Carnevale, Ugo Fedeli, Stefano Ferretti, Alba Finarelli, Livia Giordano, Roberto Grilli, David Kriebel, Andrea Micheli, Roberta Pirastu, Renato Pizzuti, Walter Ricciardi, Roberto Romizi, Stefania Salmaso, Rodolfo Saracci, Salvatore Scondotto, Paolo Vineis, Marco Zappa (*membri invitati dalla Direzione Scientifica, non in rappresentanza della proprietà*).

Modalità di abbonamento

Pagamento con carta di credito (American Express, Carta Si, VISA, Eurocard, Master Card) telefonando allo 02-48702283 dal lunedì al venerdì dalle 9 alle 13 oppure utilizzando il servizio PayPal sul sito web della rivista www.epiprev.it Versamento su conto corrente postale n. 55195440 intestato a Inferenze scrl, via Ricciarelli n. 29, 20148 Milano (segnalare la causale del versamento).

Accredito tramite c/c bancario presso: UNIPOL BANCA P.za Wagner n. 8, 20145 Milano, IBAN: IT53P 03127 01600 000000003681 intestato all'impresa editoriale Inferenze scrl, via Ricciarelli n. 29, 20148 Milano.

Si ringrazia la Fondazione IRCCS Istituto nazionale dei tumori di Milano che ospita la Cooperativa.

© Inferenze scrl, Milano

Studi su marcatori di esposizione ed effetto precoce in aree con inquinamento da arsenico: metodi e risultati del progetto SEpiAs*

Studies on markers of exposure and early effect in areas with arsenic pollution: methods and results of the project SEpiAs*

* Progetto CCM-2010 "Sorveglianza Epidemiologica in aree con inquinamento ambientale da arsenico di origine naturale o antropica"

* *Project CCM-2010 "Epidemiologic surveillance in areas with environmental pollution by arsenic of natural or anthropogenic origin"*

A cura di: Elisa Bustaffa, Fabrizio Minichilli, Fabrizio Bianchi

○ Ulteriori dati sono disponibili sul CD allegato.



Gruppo di lavoro SEpiAs / SEpiAs Working group

Maria Grazia Andreassi, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di ricerca genetica, Pisa

Marino Artusa, Ospedale Valdichiana, Dipartimento medicina interna, USL7, Montepulciano, Siena

Angela Asaro, IRCCS Fondazione S. Maugeri, Laboratorio misure ambientali e tossicologiche, Pavia

Giorgio Assennato, Agenzia regionale per la protezione dell'ambiente, Regione Puglia, Bari

Fabrizio Bianchi, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di epidemiologia ambientale e registri di patologia, Pisa

Andrea Borghini, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di ricerca genetica, Pisa

Elisa Bustaffa, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di epidemiologia ambientale e registri di patologia, Pisa

Simona Carone, Struttura complessa statistica ed epidemiologia, Registro tumori di Taranto, ASL Taranto

Girolamo Catapano Minotti, Ospedale San Raffaele, UO Cardiologia, Taranto

Achille Cernigliaro, Dipartimento attività sanitarie e osservatorio epidemiologico, Assessorato della salute, Regione Siciliana, Palermo

Francesco Cipriani, Agenzia regionale di sanità della Toscana, Firenze

Paolo Ciranni, Dipartimento attività sanitarie e osservatorio epidemiologico, Assessorato della salute, Regione Siciliana, Palermo

Alberto Ciuccarelli, Laboratorio di analisi, Ospedale di Civita Castellana, ASL Viterbo

Alessio Coi, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di epidemiologia ambientale e registri di patologia, Pisa

Liliana Cori, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di epidemiologia ambientale e registri di patologia, Pisa

Francesco Cuccaro, già Agenzia regionale per la protezione dell'ambiente, Regione Puglia, Bari

Gabriella Dardanoni, Dipartimento attività sanitarie e osservatorio epidemiologico, Assessorato della salute, Regione Siciliana, Palermo

Daniela D'Ippoliti, Dipartimento di epidemiologia del SSR del Lazio, ASL RME, Roma

Francesca Faita, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di ricerca genetica, Pisa

Francesco Faita, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di imaging cardiovascolare, polmonare e nuove tecnologie, Pisa

Provvidenza Farruggia, UO Epidemiologia, Distretto di Gela, ASP CL, Gela

Monica Ferri, Dipartimento di Epidemiologia del SSR del Lazio, ASL RME, Roma

Carmelo Ferrigno, Reparto di Cardiologia, Presidio ospedaliero Vittorio Emanuele, Gela

Ilenia Foffa, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di ricerca genetica, Pisa

Riccardo Frazzetta, Unità funzionale igiene e sanità pubblica, USL7, Ospedale dell'Amiata, Abbadia San Salvatore, Siena

Lorenzo Fugnoli, IRCCS Fondazione S. Maugeri, Laboratorio misure ambientali e tossicologiche, Pavia

Francesca Giurrandino, Laboratorio analisi chimiche e RIA Dr. Angelo Ricerca srl, Gela

Sabina Grecchi, Istituto di genetica molecolare del CNR, Pavia

Cristina Imiotti, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di epidemiologia ambientale e registri di patologia, Pisa

Sonia Marrucci, Fondazione toscana Gabriele Monasterio, Pisa

Antonella Mercuri, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di ricerca genetica, Pisa

Paola Michelozzi, Dipartimento di epidemiologia del SSR del Lazio, ASL RME, Roma

Salvatore Migliore, UO Epidemiologia, Distretto di Gela, ASP CL, Gela

Gianfranco Miloro, Centro trasfusionale Ospedale SS. Annunziata, Taranto

Aldo Minerba, Struttura complessa statistica e epidemiologia, Registro tumori di Taranto, ASL Taranto

Antonella Mincuzzi, Struttura complessa statistica e epidemiologia, Registro tumori di Taranto, ASL Taranto

Fabrizio Minichilli, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di epidemiologia ambientale e registri di patologia, Pisa

Claudio Minoia, IRCCS Fondazione S. Maugeri, Laboratorio misure ambientali e tossicologiche, Pavia

Mirella Mugnos, Unità funzionale igiene e sanità pubblica, USL7, Ospedale dell'Amiata, Abbadia San Salvatore, Siena

Daniela Nuvolone, Agenzia regionale di sanità della Toscana, Firenze

Rosanna Panini, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di epidemiologia ambientale e registri di patologia, Pisa

Claudia Prestipino, Istituto di genetica molecolare del CNR, Pavia

Mariangela Protti, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di epidemiologia ambientale e registri di patologia, Pisa

Davide Ricci, Ospedale dell'Amiata, UO cardiologia, USL7, Abbadia San Salvatore, Siena

Luciano Romanini, Unità funzionale igiene e sanità pubblica, USL7, Ospedale dell'Amiata, Abbadia San Salvatore, Siena

Anna Ronchi, IRCCS Fondazione S. Maugeri, Laboratorio misure ambientali e tossicologiche, Pavia

Enrica Santelli, Dipartimento di epidemiologia del SSR del Lazio, ASL RME, Roma

Salvatore Scondotto, Dipartimento attività sanitarie e osservatorio epidemiologico, Assessorato della salute, Regione Siciliana, Palermo

Maria Serinelli, Agenzia regionale per la protezione dell'ambiente, Regione Puglia, Bari

Ivana Scovassi, Istituto di genetica molecolare del CNR, Pavia

Rosa Sicari, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di imaging cardiovascolare, polmonare e nuove tecnologie, Pisa

Luigi Sommariva, UO emodinamica e cardiologia interventistica, Ospedale Belcolle, Viterbo

Stefano Spagnolo, Agenzia regionale per la protezione dell'ambiente, Regione Puglia, Bari

Domenico Spera, Dipartimento di prevenzione, ASL Viterbo

Loredana Stani, Laboratorio di ematologia, Ospedale G. Moscati, Taranto

Francesco Stea, Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di imaging cardiovascolare, polmonare e nuove tecnologie, Pisa

Carmelo Tonelli, Reparto di cardiologia, Presidio ospedaliero Vittorio Emanuele, Gela

Andrea Tortora, Ospedale San Raffaele, UO cardiologia, Taranto

Giordano Zampi, UO emodinamica e cardiologia interventistica, Ospedale Belcolle, Viterbo

Silvana Zolla, Laboratorio di analisi, Ospedale di Civita Castellana, ASL Viterbo

Indice

Contents

Sintesi / Synthesis	5
PARTE 1 - Rassegna della letteratura / Literature review	13
Studi epidemiologici su popolazioni umane esposte a basse e moderate concentrazioni di arsenico nelle acque potabili / Epidemiological studies on population exposed to low-to-moderate arsenic concentration in drinking water Elisa Bustaffa, Fabrizio Bianchi	14
PARTE 2 - Sorveglianza epidemiologica in aree interessate da inquinamento ambientale da arsenico di origine naturale o antropica (SEpiAS CCM 2010) Epidemiological surveillance in areas with environmental pollution by natural or anthropogenic arsenic Elisa Bustaffa, Fabrizio Minichilli, Maria Grazia Andreassi, Simona Carone, Alessio Coi, Liliana Cori, Francesca Faita, Francesco Faita, Sabina Grecchi, Claudio Minoia, Anna Ronchi, Ivana Scovassi, Rosa Sicari, Francesco Stea, Fabrizio Bianchi e Gruppo di lavoro SEpiAs	25
Riassunto / Summary	30
Introduzione / Introduction	32
1 Le conoscenze e le ipotesi / Knowledge and hypotheses	34
Caratteristiche e tossicità dell'arsenico	34
Genotossicità dell'arsenico	35
Marcatori di danno al DNA, di stress cellulare e di apoptosi.....	36
Esami cardiovascolari.....	37
2 Materiali e metodi / Materials and methods	38
Il campione di SEpiAs	38
Compiti e struttura di SEpiAs	38
Materiali di SEpiAs	38
Dettagli sulle quattro aree in studio	41
Materiali e metodi delle Unità operative	45
Metodi di analisi per la valutazione dei fattori associati alle diverse forme arsenicali	49
3 Risultati / Results	54
Arsenico nei campioni biologici	54
Analisi esplorativa	61
Caratterizzazione dei soggetti con $As_1 > 3,86 \mu g/l$ in associazione a fattori di esposizione individuati all'interno del questionario	66
Analisi di associazioni tra fattori di esposizione e concentrazione di arsenico	66
tenendo conto di fattori di confondimento o di modificazione di effetto	
Analisi delle associazioni tra marcatori di danno al DNA e concentrazioni di arsenico	71
Analisi delle associazioni tra IMT e concentrazioni di arsenico	72
4 Considerazioni finali / Final considerations	75
Livelli di arsenico nei campioni di SEpiAS	75
Soggetti con valori di arsenico superiori a soglie di diverso tipo e soggetti <i>outlier</i>	76
Protocollo di presa in carico dei soggetti <i>outlier</i>	78
Biomarcatori molecolari, di danno al DNA e di danno cardiovascolare	79

5 Conclusioni, indicazioni e raccomandazioni	80
Conclusions, guidelines and recommendations	
Indicazioni	80
Marcatori suggeriti per la sorveglianza ambiente-salute in aree con caratteristiche simili a quelle considerate da SEpiAS	81
6 Prodotti e obiettivi raggiunti / Products and objectives achieved	82
Presentazioni del progetto SEpiAS	82
Comunicazione sul progetto SEpiAS	82
Valutazione generale, criticità generali e specifiche	82
Obiettivo generale	83
Obiettivo 1	83
Obiettivo 2	84
Obiettivo 3	84
Obiettivo 4	84
Bibliografia / References	85
Glossari / Glossaries	88
Indice di tabelle, grafici e figure / Index of tables, charts and figures	92
Indice degli allegati / Index of annexes	94

Sintesi Synthesis

INTRODUZIONE

Arsenico (As) e composti arsenicali sono stati valutati cancerogeni per l'uomo da oltre 30 anni da parte dell'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC 1980, 1987). Nel 2004 l'As in acqua per uso umano è stato classificato come cancerogeno accertato per l'uomo (Gruppo 1) (Straif et al. 2009; IARC 2012). Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse per gli impatti sulla salute di esposizioni a dosi moderate di arsenico inorganico (As_i) e di forme organiche. I danni alla salute che si cominciano a esplorare per le basse dosi sono diverse patologie non tumorali con evidenze insufficienti o limitate come malattie cardiovascolari, diabete e disordini neurologici.

La valutazione dei rischi sanitari associati all'esposizione a concentrazioni di As in acqua potabile superiori a 10 µg/l (WHO 2011) e inferiori a 50 o 100 µg/l è oggetto di considerevole interesse in campo di sanità pubblica, ricerca e legislazione, anche se gli studi epidemiologici sono limitati ed eterogenei. Al proposito è stata svolta una rassegna bibliografica sugli effetti sulla salute associati all'esposizione a basse e moderate concentrazioni di arsenico nelle acque destinate al consumo umano (10-150 µg/l) con l'obiettivo di fornire una descrizione del quadro complessivo delle conoscenze. La rassegna costituisce il primo articolo del presente volume.

Negli anni recenti sono stati realizzati interventi per garantire l'adeguamento al livello di concentrazione di 10 µg/l in numerosi comuni italiani che avevano richiesto fino alla fine del 2012 la deroga ai limiti europei per l'As nelle acque per usi civili. In alcuni casi gli interventi non sono stati completati.

OBIETTIVO

L'obiettivo principale di SEpiAs è quello di valutare la relazione tra marcatori di esposizione ad arsenico, di effetto biologico precoce e di rischio per la salute, e definire indicatori per un sistema avanzato di sorveglianza ambiente-salute. Lo studio è stato effettuato in due aree caratterizzate da contaminazione da arsenico di origine prevalentemente naturale (Amiata e Viterbese) e in due aree caratterizzate da contaminazione da arsenico di origine antropica (Taranto e Gela).

DISEGNO

SEpiAs è uno studio epidemiologico osservazionale multicentrico, basato su biomonitoraggio umano e intervista tramite questionario su campioni di soggetti giovani adulti. Ogni soggetto reclutato ha effettuato un'intervista tramite questionario standardizzato, un prelievo di sangue e la raccolta di un campione di urina, una misura non invasiva di parametri clinici.

Le analisi statistiche sono state effettuate su 271 soggetti (Amiata 58, 28 maschi e 30 femmine; Viterbo 72, 32 maschi e 40 femmine; Taranto 50, 24 maschi e 26 femmine; Gela 91, 48 maschi e 43 femmine). Alla realizzazione di SEpiAs hanno collaborato, oltre all'Unità operativa (UO) di coordinamento scientifico e amministrativo, quattro UO territoriali composte dalle ASL e da istituzioni regionali ambientali o sanitarie: una dedicata alla speciazione dell'As nelle urine, una a marcatori genetici e epigenetici, una a marcatori di suscettibilità e danno al DNA, una a marcatori di rischio cardiovascolare.

MATERIALI E METODI

Il protocollo è stato approvato dai comitati etici delle ASL competenti per territorio. Sono stati coinvolti i medici di famiglia dei pazienti selezionati, informandoli di tutti i dettagli del progetto. I volontari sono stati selezionati con diverse procedure, che dipendevano da aspetti organizzativi e dal contesto locale, e al momento del prelievo dei campioni biologici e della visita cardiologica hanno ricevuto un modulo di consenso informato e un foglio informativo sulle finalità e il tipo di analisi previste.



Sono state preparate schede informative per il donatore, con i riferimenti specifici dei responsabili delle attività di prelievo e di spedizione dei campioni in ciascuna area. L'investigatore principale e il responsabile di ciascuna delle UO hanno compilato una dichiarazione di assenza di conflitto d'interessi.

Per diffondere l'informazione sul progetto e facilitare l'identificazione dei luoghi di prelievo e visita sono stati preparati un volantino informativo e una locandina per ciascuna delle quattro aree. I donatori hanno compilato, con l'assistenza di una figura addestrata, un questionario per la raccolta delle informazioni rilevanti per l'interpretazione dei risultati. Sono presentate di seguito rassegne sullo stato delle conoscenze:

- a proposito dei meccanismi metabolici e tossico-cinetici dell'As;
- sugli effetti cancerogeni e non cancerogeni di esposizioni a moderate concentrazioni di As nelle acque potabili;
- sulla genotossicità dell'As;
- sui marcatori di danno al DNA;
- sui marcatori di stress cellulare e di apoptosi;
- sugli esami cardiovascolari.

LE QUATTRO AREE INTERESSATE

Nel Rapporto SEpiAs sono incluse sezioni contenenti la caratterizzazione ambientale e sanitaria delle aree in studio.

Per l'**area viterbese** sono stati selezionati i Comuni di Civita Castellana e Ronciglione, che hanno avuto valori medi di As nelle acque destinate al consumo umano superiori a 20 µg/l (fonte ARPA Lazio). A Civita Castellana sono stati documentati (fonte DEP Lazio, <http://www.deplazio.net/>) eccessi di mortalità tra i maschi per malattie respiratorie, in particolare per broncopneumopatie cronico-ostruttive (BPCO) e per tumore del polmone; a Ronciglione eccessi per entrambi i sessi per malattie del sistema circolatorio, malattie respiratorie, diabete, e per i soli maschi per malattie ischemiche del cuore, BPCO, tumori maligni del polmone, tumori maligni della vescica.

Per l'**Amiata** è stato scelto il Comune di Abbadia San Salvatore, nel quale sono stati osservati eccessi di mortalità tra i maschi per tutte le cause, per tutti i tumori e per pneumoconiosi, tra le femmine per malattie dell'apparato digerente e insufficienza renale. Le analisi sui ricoverati nel 2004-2006 hanno evidenziato eccessi per malattie respiratorie acute in entrambi i generi, per tumore dello stomaco, malattie genito-urinarie e polmonite tra i maschi, per malattie polmonari cronico-ostruttive tra le femmine.

L'area di **Taranto** è caratterizzata da vari insediamenti industriali, sorgenti emmissive di As. L'Inventario nazionale ed europeo delle emissioni e loro sorgenti nel periodo 2003-2010 ha riportato, per la provincia di Taranto, una riduzione di emissioni di As nell'acqua (da 1.463,7 a 655 kg/anno) e nel periodo 2006-2010 un aumento nell'aria (da 24,1 a 186,2 kg/anno). Lo stato di salute della popolazione di Taranto mostra numerose criticità. La stima del rischio cancerogeno per via inalatoria attribuito all'arsenico emesso dallo stabilimento siderurgico ILVA risulta inferiore a 1:100.000 anche in prossimità dell'area industriale; il 2,7% del rischio cancerogeno totale per via inalatoria è attribuito all'arsenico (fonte ARPA Puglia).

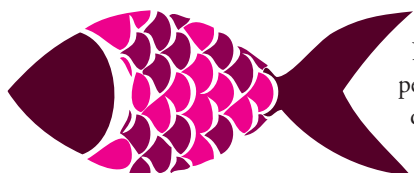
L'area di **Gela** è stata definita dalla Regione Sicilia, insieme ai Comuni di Butera e Niscemi, «area a elevato rischio di crisi ambientale». L'As è stato monitorato in concentrazioni superiori ai limiti normativi nelle acque di falda (fino a 25.000 volte il limite normativo) e nel suolo (fino 1,5 volte la concentrazione soglia di contaminazione di 20 mg/Kg), mentre nell'aria sono stati riscontrati valori medi di As inferiori al valore soglia di 6 ng/m³. Nel 2010 la raffineria di Gela ha emesso in atmosfera 32 kg di arsenico e 1,52 tonnellate nelle acque (fonte: E-PRTR).

L'analisi della mortalità 2004-2011 ha evidenziato eccessi di mortalità generale, per tutti i tumori, per malattie cardiovascolari e cerebrovascolari in entrambi i sessi, per tumore dello stomaco tra i maschi, e per tumore della trachea, dei bronchi e polmone, morbo di Hodgkin, malattie ischemiche del cuore tra le femmine. Il quadro dei ricoveri 2007-2011 è caratterizzato da eccessi per tutte le cause e per tutti i tumori in entrambi i sessi, e per moltissime altre cause tumorali e non tumorali.

MARCATORI

Marcatori di esposizione

Nelle urine è stata effettuata la speciazione per l'As nelle forme inorganiche, trivalenti e pentavalenti, e in quelle organiche, quantificate mediante l'utilizzo di uno spettrometro di massa accoppiato induttivamente (DRC-ICP-MS) previa separazione cromatografica (HPLC).



Marcatori molecolari ed epigenetici



E' stata condotta l'analisi genotipica per l'identificazione di polimorfismi funzionali in geni coinvolti nel metabolismo dell'arsenico, nei processi di detossificazione e nei processi di riparazione del DNA. Sono stati genotipizzati i polimorfismi AS3MT Met287Thr, XRCC1 Arg399Ser, hOGG1 Ser326Cys, delezione di GST-M1, delezione di GST-T1. E' stato analizzato lo stato di metilazione dei geni p53 e p16 e del gene p21 mediante analisi qualitativa con PCR metilazione specifica (MSP).

Marcatori di danno al DNA, di stress cellulare e di apoptosi

Sono state fatte valutazioni della forma fosforilata dell'istone H2AX per verificare il danno al DNA, la sintesi di poli(ADP-ribosio) come risposta a condizioni di stress, l'apoptosi mediante vari parametri morfologici e biochimici.

Marcatori di rischio cardiovascolare

Sono stati valutati lo spessore medio intimale carotideo come indice ultrasonografico di danno preclinico, la compliance arteriosa, lo score del calcio e il grasso pericardico.

METODI DI ANALISI PER LA VALUTAZIONE DEI FATTORI ASSOCIATI ALLE DIVERSE FORME ARSENICALI

L'obiettivo è valutare i fattori associati al livello di forme arsenicali in un campione di soggetti residenti nelle quattro aree di studio. L'analisi statistica ha considerato: $As_i=As(III)+As(V)$ e $As_i+MMA+DMA$, per interesse tossicologico e per la disponibilità di valori di riferimento suggeriti dalla Società Italiana Valori di Riferimento: per As_i da 0,1 a 1,5 $\mu\text{g/l}$; per $As_i+MMA+DMA$ da 2 a 15 $\mu\text{g/l}$.

Le analisi sono state effettuate utilizzando i pacchetti statistici R e STATA 13.

DISTRIBUZIONE DEI LIVELLI DI ARSENICO NEL CAMPIONE IN STUDIO

Le distribuzioni dei livelli di arsenico nel campione in studio sono risultate asimmetriche con diversi valori sotto il LOD o sopra il 95° percentile. Per descrivere al meglio i campioni biologici di arsenico sono stati usati la media geometrica (MG), la mediana, il 25°, il 75° e il 95° percentile (P25, P75, P95), la deviazione standard (DS) e gli intervalli di confidenza al 95% di probabilità della MG (IC95%). E' stata valutata la presenza di valori elevati per area e per sesso (*outlier*), definiti utilizzando diversi criteri:

- soggetti con concentrazione maggiore del P95 della distribuzione complessiva dell' As_i nelle 4 aree;
- soggetti con valore di $As_i > 1,5 \mu\text{g/l}$;
- soggetti con valore di $As_i+MMA+DMA > 15 \mu\text{g/l}$;
- soggetti con valore di $As_i+MMA+DMA > 19,3 \mu\text{g/l}$ (3,86 $\mu\text{g/l}$ per As_i), proposto da Hays et al. (2010), come valore che identifica l'elevata priorità nella valutazione di rischio nei processi di follow-up.

E' stata valutata per area e per sesso la percentuale di As_i e di arsenico metilato sulla misura totale. Sono stati descritti gli indici di metilazione primario (MMA/As_i), secondario (DMA/MMA) e totale (DMA/As_i). Attraverso un modello di regressione lineare multivariato è stato valutato l'effetto delle interazioni tra zona, sesso ed età sulla concentrazione di As. La significatività statistica delle interazioni è stata valutata tramite test del rapporto di verosimiglianza (confronto tra modello con interazioni e senza interazioni).

ANALISI DELLE ASSOCIAZIONI TRA FATTORI DI ESPOSIZIONE E CONCENTRAZIONE DI ARSENICO

Lo scopo è valutare associazioni significative tra fattori di esposizione, di suscettibilità genetica e concentrazione di arsenico. L'analisi ha preso in considerazione sia fattori di esposizione riportati in letteratura come associati a esposizioni ad arsenico sia fattori risultati significativi dalle analisi esplorative. Sono state considerati solamente le variabili che presentano variazioni di MG statisticamente significative ($p < 0,05$) o ai limiti della significatività ($p < 0,10$) e con un numero di casi maggiore o uguale a 3.

Le variabili selezionate dal questionario riguardano: zona, sesso, classe di età, consumo di acqua da bere, consumo di acqua per cucinare, esposizione lavorativa, stili di vita, storia medica, dieta, consumo di alimenti di produzione propria e/o locale, polimorfismi genetici selezionati (AS3MT, GST-T e GST-M).

Per ciascun fattore di esposizione è stata valutata l'associazione con il livello sia di As_i sia di $As_i+MMA+DMA$. Le differenze significative sono state valutate mediante test t di Student per campioni indipendenti ($p < 0,01$). Le analisi sono state svolte su tutto il campione e separatamente per area e per sesso per poter identificare i fattori di esposizione significativi, specifici per area e per sesso.



Analisi delle associazioni tra fattori di esposizione e concentrazione di arsenico tenendo conto di fattori di confondimento o di modificazione di effetto

Per ciascuno dei fattori di interesse individuati è stato calcolato il rapporto tra medie geometriche (MG) dell'arsenico negli esposti/consumatori e MG nei non esposti/non consumatori (rapporto tra medie geometriche, RMG). Attraverso un modello di regressione multilinare è stato valutato l'effetto di interazione tra polimorfismi e ciascun fattore di esposizione. La significatività statistica delle interazioni è stata valutata tramite test del rapporto di verosimiglianza.

E' stato calcolato il rapporto tra la MG dell'arsenico negli esposti/consumatori e la MG nei non esposti/non consumatori, effettuando un aggiustamento delle stime per altri fattori associati all'aumento dell'arsenico.

Le analisi di regressione sono state eseguite su tutto il campione e separatamente per area e per sesso.

Per i fattori che sono risultati statisticamente significativi è stata valutata l'entità dei RMG, l'eccesso/difetto della MG negli esposti rispetto ai non esposti, il superamento del limite di 1,5 µg/l e di 3,86 µg/l per As_i e di 15 µg/l e 19,3 µg/l per As_i +MMA+DMA, tra gli esposti.

Infine sono stati caratterizzati i soggetti *outlier* con $As_i > 25$ µg/l (P95 della distribuzione totale di As_i).

Analisi delle associazioni tra marcatori di danno al DNA e concentrazioni di arsenico

L'analisi dell'associazione delle varie forme arsenicali con l'istone H2AX e con la proteina PARP-1 è stata eseguita con analisi di regressione semplice. E' stata inoltre eseguita un'analisi multilinare per valutare le associazioni tra l'arsenico e i marcatori di danno al DNA tenendo conto di alcune variabili del questionario considerate associate a stress ossidativo. Le analisi sono state svolte sul totale dei soggetti, per sesso e per area. Le differenze sono state testate mediante test t per dati indipendenti.

Analisi delle associazioni tra IMT e concentrazioni di arsenico

Questa analisi è stata condotta per valutare la variazione dell'IMT in funzione di As_i e As_i +MMA+DMA considerando le soglie di 3,86 µg/l e 19,3 µg/l, rispettivamente. Mediante analisi di regressione bivariata è stato valutato l'effetto congiunto dell'arsenico (sia As_i sia As_i +MMA+DMA) con i marcatori genetici e della suscettibilità genetica sull'IMT.

Le differenze sono state testate mediante test t per dati indipendenti. L'analisi è stata eseguita sul totale dei soggetti, per sesso e per area.

RISULTATI E DISCUSSIONE

ARSENICO NEI CAMPIONI BIOLOGICI

I livelli urinari sia di As_i sia di As_i +MMA+DMA hanno mostrato un'elevata variabilità all'interno delle aree e tra aree. La valutazione dei valori medi e di quelli più elevati delle distribuzioni dei 4 campioni mostra similitudini tra i campioni di Gela e Taranto, che risultano spostati verso l'alto, una posizione intermedia del campione viterbese e valori più bassi del campione dell'Amiata.

Distribuzione dei casi secondo i vari cut-off

L'analisi delle concentrazioni urinarie di As_i e di As_i +MMA+DMA ha mostrato numerosi valori più elevati di quelli suggeriti dalla SIVR per la popolazione non esposta. Nel campione SEpiAs sono risultati più elevati della soglia superiore proposta per l' As_i (1,5 µg/l), 137 su 271 campioni, pari al 50,6% (61,4% tra i maschi e 40,3% tra le femmine). Le percentuali maggiori si osservano nell'area di Gela (67%), seguita da Taranto (58%) e Viterbese (48,6%), mentre nell'Amiata si registra un minor numero di casi. In tutte le aree emerge un sostanziale allineamento tra maschi e femmine a eccezione di Gela, dove si evidenzia una percentuale nei maschi più elevata rispetto alle femmine.

I campioni con As_i +MMA+DMA >15 µg/l risultano il 25,1% nel complesso delle quattro aree: 30,3% tra i maschi e 20,1% tra le femmine. Le percentuali più alte si trovano nel campione di Gela, seguito da quello di Taranto, mentre i valori riscontrati nel Viterbese e nell'Amiata sono più bassi. Nelle aree di Amiata e Taranto emerge un sostanziale allineamento tra maschi e femmine mentre a Gela, e in modo più pronunciato nel Viterbese, si osserva una più elevata percentuale tra i maschi. Da notare che tutti i soggetti avevano $As_i > 1,5$ µg/l.

Scegliendo come cut-off il valore di 25 µg/l, corrispondente al P95 della distribuzione complessiva dell' As_i nelle 4 aree, emerge che:

- i soggetti con livello di $As_i > 25$ µg/l sono risultati 15 (5 maschi, 10 femmine) ripartiti in: 6 a Taranto

(1 maschio, 3 femmine), 5 a Gela (2 maschi, 3 femmine), 3 nel Viterbese (1 maschi, 2 femmine), 1 nell'Amiata (1 maschio);

■ tra questi soggetti, 1 a Gela ha mostrato un valore $>50 \mu\text{g/l}$, altri 5 soggetti (3 a Taranto, di cui 1 maschio e 2 femmine; 2 femmine nel Viterbese) hanno mostrato valori $>100 \mu\text{g/l}$.

As totale e quattro specie misurate, «altre forme» stimate e rapporto sul totale

In particolare, nelle aree l' As_i rappresenta il 21-27% dell'arsenico totale, assumendo valori inferiori tra le femmine dell'Amiata e superiori tra i maschi di Taranto e Gela. L'MMA assume valori proporzionalmente superiori nei campioni dell'Amiata, mentre il DMA presenta percentuali più simili nei diversi campioni, comprese in un range tra il 50,5% e il 57,8%. Tali dati rafforzano l'immagine di profili diversificati tra aree, con la maggiore distanza tra Amiata e Gela, similitudini tra maschi e femmine nei campioni dell'Amiata e di Viterbo e differenze tra sessi a Gela e a Taranto, dove tra i maschi l' As_i ha maggior peso, ma le altre forme sono diversamente rappresentate.

Dal confronto con altri dati, emerge che:

- i risultati ottenuti sull'Amiata per quanto attiene l' As totale sono in linea con quanto misurato in uno studio di biomonitoraggio effettuato in quattro Comuni dell'Amiata, tra cui quello di Abbadia San Salvatore, da AUSL 7 senese e ARPA Toscana in collaborazione con l'Istituto superiore di sanità (AUSL 7, Siena);
- i risultati ottenuti nel Viterbese relativi all' As_i sono concordanti come media e superiori come valori più elevati rispetto a quelli ottenuti da uno studio precedente condotto nel Lazio (Cubadda et al. 2012), mentre considerando la somma di As_i +MMA+DMA i valori medi e i valori più elevati del campione SEpiAs sono risultati inferiori a quelli osservati dagli stessi autori su citati;
- i risultati del campione di Taranto riferiti all' As totale sono più elevati di quelli precedentemente ottenuti da uno studio su 49 lavoratori di fonderia confrontati con 50 soggetti della popolazione per i quali non erano state segnalate anomalie (Soleo et al. 2012);
- i risultati conseguiti a Gela sono in accordo con quelli del biomonitoraggio umano (BMU) precedentemente effettuato nell'ambito dello studio SEBIOMAG, che aveva indagato numerosi elementi in traccia e composti organici identificando valori anomali di arsenico totale in oltre il 20% del campione studiato (Bianchi et al. 2013).

Indice di metilazione primaria, secondaria e totale

L'analisi congiunta degli indici di efficienza di metilazione evidenzia nel campione dell'Amiata una buona efficienza di metilazione primaria, compensata da una peggiore efficienza secondaria, testimoniata dal valore più basso del rapporto DMA/MMA. Un profilo opposto si osserva per gli uomini di Gela, caratterizzati da una elevata presenza di As_i , da una elevata efficienza secondaria, mentre l'efficienza totale risulta modesta. In contrasto, per le donne di Gela si osservano una buona efficienza primaria e una bassa efficienza secondaria e totale. Il campione di Viterbo è invece caratterizzato da valori intermedi di efficienza primaria e valori medio-alti di efficienza secondaria e totale.

Rapporto As(III) su As(V)

Si osserva che As(III) prevale maggiormente su As(V) nei campioni viterbesi e tra le femmine gelesi, confermando la diversità di *pattern* tra aree e tra generi. I risultati supportano l'indicazione all'uso della somma dell'arsenico trivalente e pentavalente come indicatore più stabile di As_i .

ANALISI DI ASSOCIAZIONI TRA FATTORI DI ESPOSIZIONE E CONCENTRAZIONE DI ARSENICO TENENDO CONTO DI FATTORI DI CONFONDIMENTO O DI MODIFICAZIONE DI EFFETTO

Dal complesso delle analisi effettuate è emerso che per quanto riguarda l'uso di acqua è da segnalare l'associazione inversa emersa per l'uso di acqua imbottigliata per le femmine dell'Amiata e per entrambi i generi di Viterbo (MG significativamente più bassa tra i consumatori rispetto ai non consumatori) e l'associazione diretta con l'uso di acqua di acquedotto per bere per le femmine dell'Amiata e per i soggetti di Viterbo, e per cucinare soggetti per entrambi i generi di Viterbo.

Per quanto riguarda l'esposizione lavorativa, appaiono rilevanti le indicazioni emerse per gli uomini dei campioni di Taranto e Gela che hanno mostrato eccessi del valore medio di As_i in associazione a diverse esposizioni occupazionali autodichiarate, quali silice o lana di vetro, asbesto, derivati del petrolio, prodotti chimici. Per le donne dei campioni di Viterbo e Taranto emerge un segnale, considerando l'esposizione a solventi organici, tinture, acidi, sebbene sostenuto da pochi casi.

A proposito della **dieta**, occorre considerare che il consumo su base settimanale include livelli da bassi a elevati di consumo e l'informazione sul consumo di prodotti locali rappresenta una voce esposta a forte soggettività. Alcuni risultati sono tuttavia ritenuti degni di attenzione soprattutto quando in linea con le conoscenze disponibili. Indicazioni di rilievo per l'associazione con livelli medi di As_i emergono per il consumo di latte, in prevalenza intero, sia per le donne sul campione totale e dell'area di Viterbo, sia per l'insieme dei due sessi nei campioni di Taranto e Gela.

Il **consumo di pesce** è risultato associato a maggiori valori di As_i nel campione complessivo e nei campioni di Viterbo e Gela, in particolare tra gli uomini. Altri risultati di potenziale interesse emersi per il consumo di latticini, carne di manzo, di maiale e di agnello nell'Amiata, sono sostenuti da valori medi di As_i bassi rispetto ai riferimenti e/o basati su un numero di soggetti/campioni troppo piccolo per consentire speculazioni. I risultati significativi ottenuti per il consumo di pollo e di cavallo a Taranto e di vino a Gela, invece, forniscono indicazioni per ulteriori approfondimenti.

La valutazione dell'informazione sul tipo di **produzione propria o locale** evidenzia risultati di rilievo per la verdura fresca, che risulta associata a valori medi di As_i più elevati tra i consumatori del campione complessivo delle quattro aree, in particolare tra le femmine, tra le donne del Viterbese e nel campione complessivo di Taranto. Il risultato emerso sul campione complessivo è rafforzato considerando il consumo di frutta fresca. A Taranto si osservano, inoltre, valori medi di As_i più elevati tra i consumatori di pesce di produzione propria/locale. I risultati ottenuti dalle analisi su As_i +MMA+DMA sono sovrapponibili a quelli ottenuti su As_i con le variabili di tipo occupazionale in genere prerogativa di Taranto e Gela.

Correlazione tra variabili risultate più informative dalle analisi univariate e multilineri

L'analisi ha mostrato risultati statisticamente significativi diversificati tra aree. Tali risultati sono indicativi di possibili sinergie tra variabili emerse come maggiormente associate a un aumento di As_i (per esempio, alcuni soggetti che bevono acqua di acquedotto bevono anche acqua di pozzo, alcuni soggetti occupati nell'industria chimica hanno anche consumato prodotti della pesca, e così via). La valutazione del tipo di sinergismo (additivo, moltiplicativo, altro) richiede analisi specifiche su campioni più numerosi.

ANALISI DELLE ASSOCIAZIONI TRA MARCATORI E CONCENTRAZIONI DI ARSENICO

Biomarcatori molecolari

I risultati delle analisi condotte sui polimorfismi genetici confermano l'importanza del polimorfismo $AS3MT$ *Met287Thr* e dei geni $GST-T1$ e $GST-M1$ coinvolti nel processo di biotrasformazione e metabolismo dell'arsenico. È stato inoltre confermato un significativo effetto interattivo del polimorfismo dell'enzima $OGG1$ nell'induzione di alterazioni vascolari.

Biomarcatori di danno al DNA

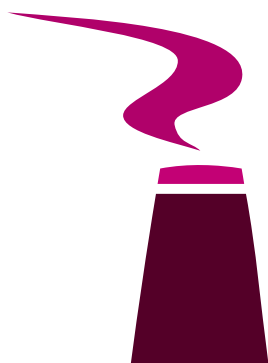
I risultati sui marcatori di stress cellulare hanno mostrato una tendenza al loro aumento in corrispondenza di valori elevati di As_i . L'osservazione che i soggetti con As_i sopra il cut-off presentano valori di PAR e H2AX più alti si riferisce a tutte le aree e risulta valida sia nei maschi sia nelle femmine. Tali risultati, anche se non statisticamente significativi, offrono spunti per approfondimenti futuri.

Biomarcatori di danno cardiovascolare

Premettendo che i valori di IMT sono tutti in un range di valori non patologici compresi tra 0,49 e 0,58 (tipici della popolazione giovane-adulta), dalle analisi effettuate viene messa in evidenza una tendenza all'aumento dei valori medi di IMT nei maschi del Viterbese, Taranto e Gela con $As_i \geq 3,86 \mu\text{g/l}$, con scostamento maggiore tra i maschi di Taranto e Gela. Dato che a Gela, in particolare nei maschi, si osservano valori più elevati di As_i e aumenti dei valori di IMT in funzione dell'età estremamente più elevati rispetto ai valori di riferimento, tale associazione potrebbe indicare una particolare sensibilità dell'IMT alla tipologia di inquinanti presenti nel territorio di Gela. Infatti, un'analisi di effettuata incrociando la variabile occupazione nell'industria chimica con l'IMT, aggiustando per i fattori ipotizzati come confondenti, ha mostrato un aumento statisticamente significativo dell'IMT nei soggetti maschi occupati rispetto ai non occupati.

SOGGETTI CON VALORI DI ARSENICO SUPERIORI A SOGLIE DI DIVERSO TIPO E SOGGETTI OUTLIER

Sono stati usati due diversi approcci per l'identificazione di valori anomali. Il primo tipo è basato sull'uso di **soglie di riferimento** proposte da società come la SIVR o desumibili dalla letteratura scientifica, il se-



condo tipo sfrutta **indicatori statistici** calcolabili sulla stessa distribuzione dei valori misurati nella casistica in studio. La scelta di valori soglia più o meno restrittivi comporta l'identificazione di gruppi rispettivamente più ampi o più ridotti di casi con valori anomali, con implicazioni diverse in termini di sanità pubblica (presa in carico degli *outlier*, misure preventive), di ricerca (approfondimenti o ulteriori studi), di comunicazione pubblica. E' evidente la forte connotazione soggettiva della scelta, che deve essere motivata *a priori* in aderenza agli obiettivi prefissati.

Nel caso di SEpiAs, utilizzando il valore del 95° percentile della distribuzione generale dell'As_i, pari a 25 µg/l, si osservano 15 casi *outlier* distribuiti come segue: 1 caso >150 µg/l (1 femmina a Taranto); 4 casi 100-150 µg/l (2 femmine nel Viterbese, 1 femmina e 1 maschio a Taranto); 1 caso 50-100 µg/l (1 femmina a Gela); 9 casi 25-50 µg/l (1 maschio nel Viterbese, 1 femmina in Amiata, 3 femmine a Taranto, 2 femmine e 2 maschi a Gela).

Un approfondimento delle principali caratteristiche dei soggetti *outlier* è presentata nel rapporto, per supportare l'individuazione di azioni mirate di prevenzione e per caratterizzare insiemi di soggetti con simili caratteristiche nella stessa area.

Nel rapporto sono presentati e discussi i risultati dei confronti con diversi valori soglia. Il disallineamento dei risultati ottenuti con valori soglia diversi mette in evidenza un ruolo molto più importante delle forme metilate dell'As_i a Gela e a Taranto, indicativo di fonti di esposizione probabilmente diverse, rispetto al Viterbese e all'Amiata, con qualche differenziazione anche tra Taranto e Gela. Per comprendere i diversi profili occorrono ulteriori approfondimenti, a iniziare dalle abitudini alimentari che possono essere diverse, in particolare nell'uso di prodotti della pesca, nell'assunzione di cereali, ma anche di latticini, verdura e frutta, oltre all'acqua.

Indipendentemente dal tipo di soglia utilizzata, **resta il problema dell'attribuzione del significato in termini di esposizione, di effetto biologico, di potenziale impatto sulla salute.** Al proposito sono cruciali le conoscenze disponibili sul piano epidemiologico e tossicologico che, per quanto concerne l'As, sono evolute sulle alte dosi, mentre sono più immature sulle basse dosi.

Viene formulata una proposta di «Protocollo di secondo contatto per i soggetti *outlier*», redatto a seguito della consultazione con gli operatori delle aziende sanitarie locali coinvolte nel progetto, in accordo con la richiesta della DG Prevenzione del Ministero della salute.

CONCLUSIONI E INDICAZIONI

I valori che emergono dagli studi di biomonitoraggio umano (BMU) dell'As urinario sono informativi: per medici e operatori di sanità pubblica, per stabilire se un soggetto è stato esposto a livelli più elevati di quelli trovati in campioni rappresentativi della popolazione; per i decisori, per fare scelte basate su dati individuali di esposizione di elevata affidabilità; per i ricercatori, per pianificare e condurre studi su esposizione ed effetti sulla salute.

Il BMU ha lo scopo di:

- caratterizzare il livello di esposizione delle comunità potenzialmente esposte: per questo il BMU deve essere ripetuto nel tempo;
- individuare aree/gruppi a maggiore esposizione per i quali attivare uno specifico BMU;
- accrescere la comprensione delle cause dell'alterata esposizione, che può essere più facile quando le vie di esposizione sono semplificate (arsenico veicolato dall'acqua in cui è monitorato), o più complesse, dove esistono fattori di rischio molteplici e interagenti (fattori ambientali, individuali, attività antropiche, dieta) con conseguenti vie di esposizione che possono aver bisogno di approfondimenti dedicati.

L'indagine campionaria su parametri biologici comporta l'identificazione di valori anomali rispetto ai valori centrali della distribuzione. La gestione di soggetti portatori di valori anomali è un obbligo sanitario ed etico nei confronti di chi ha partecipato al BMU.

Dai risultati di SEpiAs emergono numerose indicazioni su attività da effettuare in aree con inquinamento da arsenico conosciuto o ipotizzato sulla base di dati ambientali e/o di BMU:

- a. effettuare sempre la somministrazione di un questionario standardizzato ai soggetti reclutati per i dosaggi di As, che deve prestare speciale attenzione alla raccolta di informazioni su consumi di acque per bere, cucinare, lavarsi, innaffiare, sulle abitudini alimentari, sul lavoro svolto e sulle esposizioni occupazionali e incidentali, sulla presenza di fonti di contaminazione ambientale con particolare riferimento a combustione di carburanti fossili, parchi minerari, presenza di discariche di rifiuti industriali e speciali, aree con irrorazione di pesticidi;
- b. effettuare la speciazione dell'As nelle urine, usando l'As_i come marcatore di esposizione a breve termine,

l'As_i+MMA+DMA come marcatore di esposizione a breve-medio termine, e l'As totale nelle unghie nelle circostanze in cui si ritenga necessario disporre di stime di esposizione di medio termine;

c. valutare il contenuto di As delle acque pubbliche, sia di rete sia di pozzi, e di alimenti di produzione locale, ove possibile determinando le specie dell'As;

d. valutare, ove indicato da studi di primo livello di complessità, l'esposizione alimentare negli stessi soggetti, effettuando la speciazione dell'As negli alimenti consumati (dieta duplicata);

e. eseguire le analisi di polimorfismi in geni che codificano per enzimi coinvolti nei processi di metilazione e di detossificazione dell'As_i, con priorità a AS3MT e GST-T1, per i quali in SEpiAs è emerso un ruolo significativo;

f. eseguire valutazioni dei marcatori di rischio cardiovascolare, con riferimento all'ecg per la valutazione del tratto Q-T e all'ecocolordoppler carotideo per la valutazione dello spessore medio intimale (IMT), in gruppi campionari non giovani (solo in gruppi già identificati a rischio);

g. produrre stime di rischio mediante studi epidemiologici analitici e procedura di *risk assessment*;

h. produrre raccomandazioni per la gestione del rischio, in collaborazione con i soggetti partecipanti;

i. utilizzare i risultati conseguiti e i materiali e metodi messi a punto per la definizione di un sistema di sorveglianza su esposizione e rischio;

j. definire azioni e misure di prevenzione primaria.

Sulla base dei risultati conseguiti, queste indicazioni generali possono essere specificate per le quattro aree di SEpiAs.

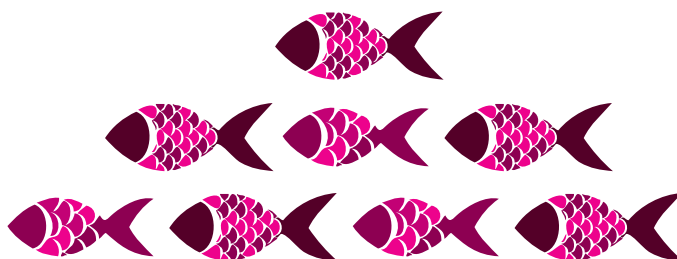
■ Per l'Amiata c'è indicazione per un intervento mirato su pochi soggetti, e a livello di comunità per una prosecuzione della sorveglianza mediante ripetizione periodica di campagne di BMU senza particolari approfondimenti (attività **a, b, c**).

■ Per il Viterbese ci sono indicazioni alla presa in carico di alcuni soggetti, e a livello di comunità per la continuazione del BMU accompagnato da studio sulla dieta, adottando il protocollo completo (attività **a-j**), escludendo in prima istanza approfondimenti sui rischi cardiovascolari.

■ Per Taranto e Gela ci sono indicazioni per la presa in carico di numerosi soggetti, e a livello di comunità per lo svolgimento di una campagna di BMU ad ampio spettro utilizzando il protocollo completo (attività **a-j**), con particolare attenzione al recupero di informazioni approfondite sul profilo alimentare, residenziale e occupazionale.

Sulla base dei risultati conseguiti da SEpiAs, nel rapporto esteso, sono suggeriti alcuni marcatori per la sorveglianza ambiente-salute in aree con caratteristiche simili a quelle considerate da SEpiAs, altri marcatori per approfondimenti di ricerca.

Quello che in conclusione si sottolinea è che in aree diversamente caratterizzate dal punto di vista ambientale, sociale e culturale, ci sono le evidenze sufficienti per raccomandare la costruzione di protocolli standardizzati ma al contempo sito-specifici per il biomonitoraggio umano.



PARTE I

Rassegna della letteratura

Literature review

eap

Studi epidemiologici su popolazioni umane esposte a basse e moderate concentrazioni di arsenico nelle acque potabili

Epidemiological studies on population exposed to low-to-moderate arsenic concentration in drinking water

Elisa Bustaffa, Fabrizio Bianchi

Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di epidemiologia ambientale e registri di patologia, Pisa

Corrispondenza: Elisa Bustaffa; e-mail: elisa.bustaffa@ifc.cnr.it

Riassunto

L'arsenico e i suoi composti inorganici sono classificati come cancerogeni certi per l'uomo. Molti studi epidemiologici condotti in aree del mondo caratterizzate da elevate concentrazioni di arsenico nelle acque potabili, anche fino a 3.000 µg/l, riportano associazioni tra l'esposizione ad arsenico e cancro della pelle, della vescica, del polmone, del fegato e dei reni, così come malattie cardiovascolari, diabete ed effetti sia sulla riproduzione sia sullo sviluppo.

La popolazione generale non è solitamente esposta a queste concentrazioni di arsenico e negli ultimi anni sta crescendo sempre più la preoccupazione che anche moderate o basse concentrazioni di arsenico nelle acque potabili (10-150 µg/l) possano indurre esiti dannosi sulla salute umana. L'Organizzazione mondiale della sanità raccomanda per l'arsenico nelle acque potabili il valore massimo di 10 µg/l.

Quasi tutti gli studi epidemiologici condotti su popolazioni esposte a concentrazioni di arsenico nelle acque potabili, da basse a moderate, sono limitati a causa dei problemi derivanti sia dalla valutazione dell'esposizione individuale sia dalla bassa numerosità delle popolazioni in studio.

Lo scopo di questa rassegna è raccogliere ciò che è presente in letteratura per quanto riguarda gli effetti sulla salute associati all'esposizione a concentrazioni di arsenico, da basse a moderate, nelle acque destinate al consumo umano (10-150 µg/l) in modo da cercare di ottenere un quadro globale degli esiti che tale esposizione può avere sulla popolazione generale.

Epidemiol Prev 2014; 38 (3-4) suppl 1: 14-24

Parole chiave: arsenico, acque destinate al consumo umano, concentrazioni da basse a moderate, effetti sulla salute

Abstract

Arsenic and its inorganic compounds are classified as human carcinogens. Several epidemiological studies conducted in areas of the world characterized by high arsenic concentration in drinking water, even up to 3,000 µg/l, report associations between arsenic exposure and skin, bladder, lung, liver and kidney cancer as well as cardiovascular diseases, diabetes and reproductive and developmental effects. Since general population is not exposed to these high arsenic concentrations in the last years attention focused on adverse health effects that low-to-moderate arsenic concentrations (0-150 µg/l) in drinking water could induce. The World Health Organization recommends a maximum limit of 10 µg/l for arsenic in drinking water.

Almost all epidemiological studies conducted on populations exposed to low-to-moderate arsenic concentrations in drinking water are limited due to problems arising from both individual exposure assessment and low subjects number.

The aim of the present review is to collect literature-based evidences regarding adverse health effects associated with exposure to low-to-moderate arsenic concentrations in drinking water (10-150 µg/l) in order to obtain a comprehensive picture of the health outcomes that such exposure can have on general population.

Epidemiol Prev 2014; 38 (3-4) suppl 1: 14-24

Key words: arsenic, drinking water, low to moderate concentrations, health outcomes

E' ormai noto che l'International Agency for Research on Cancer (IARC) classifica l'arsenico (As) e i suoi composti inorganici come appartenenti al Gruppo 1 e quindi sicuramente cancerogeni per l'uomo.¹ Studi epidemiologici hanno infatti osservato che l'esposizione a elevate concentrazioni di arsenico inorganico nelle acque potabili è associata a un aumento del rischio di cancro della vescica,²⁻⁵ del polmone,⁵⁻¹² della pelle,¹³⁻¹⁶ dei reni, della prostata e del fegato,¹⁶⁻²⁴ così come un aumento di rischio per malattie cardiovascolari, diabete ed effetti sia sullo sviluppo sia sulla riproduzione.^{25,26}

Questi studi sono condotti in aree del mondo caratterizzate da elevate concentrazioni di arsenico nelle acque potabili che in alcuni casi sfiorano i 3.000 µg/l, come per esempio Taiwan, Bangladesh e Cile. Solitamente, però, la popolazione generale non è esposta a livelli così elevati di arsenico nelle acque potabili e negli ultimi anni sta crescendo sempre più la preoccupazione che anche moderati o bassi livelli di arsenico nelle acque potabili possano indurre esiti dannosi sulla salute umana. La valutazione dei rischi per la salute dovuti a esposizioni a concentrazioni relativamente elevate di arsenico (10-150 µg/l) è diventata, infatti, oggetto di un considerevole interesse nel campo sia della legislatura sia della salute pubblica. Il National Council of Research (NRC) degli Stati Uniti ha affermato chiaramente che «*additional epidemiologic evaluations are needed to characterize the dose-response relationship for arsenic-associated cancer and non cancer endpoints, especially at low doses*» e allo stesso tempo conclude che la linea guida di «*50 µg/l does not achieve... public health protection, and therefore, requires downward revision as promptly as possible*».²⁷ Come conseguenza, l'Organizzazione mondiale della sanità (World Health Organization – WHO) raccomanda per l'arsenico nelle acque potabili il valore massimo di 10 µg/l.²⁸

Quasi tutti gli studi epidemiologici condotti su popolazioni esposte a concentrazioni di arsenico da basse a moderate nelle acque potabili sono limitati a causa del problema relativo alla valutazione dell'esposizione individuale. Il grado con il quale le stime di rischio di questi studi riflettono il «vero» rischio dipendono, infatti, dall'accuratezza delle stime e dall'appropriata identificazione del periodo di esposizione rilevante, che nel caso dell'arsenico può essere anche di decine di anni precedenti la diagnosi.²⁹ Commettere errori relativamente piccoli durante i periodi di esposizione può avere serie conseguenze sul rischio osservato. Alcuni errori nella stima dell'esposizione pregressa sono inevitabili e quando è presente un vero rischio e la misclassificazione dell'esposizione è di tipo non-differenziale, si crea un *bias* nella stima del rischio, che tende a zero. Tale misclassificazione, cioè, genera una sottostima del vero rischio. L'errore nella stima delle esposizioni, quindi, può diventare talmente grande da rendere problematica l'individuazione di un piccolo aumento nell'eccesso di rischio. Un altro problema riscontrato è che molti di questi studi hanno una bassa numerosità e ciò limita la loro potenza statistica nell'individuare livelli di rischio più bassi.

A fronte delle limitazioni sopra descritte riguardanti gli studi epidemiologici che non valutano l'esposizione individuale all'arsenico, la totalità degli studi concorda sulla necessità di effettuare studi di coorte prospettici che prevedano una valutazione dell'esposizione di tipo individuale in modo da poter stabilire la cau-

salità delle associazioni evidenziate. E' quindi necessario uno sforzo per stimare in modo accurato l'esposizione pregressa ad arsenico a livello individuale attraverso studi statistici robusti e con grande numerosità con l'obiettivo di ottenere risultati attendibili.

Lo scopo di questa rassegna è raccogliere ciò che è presente in letteratura per quanto riguarda gli effetti sulla salute associati all'esposizione a basse e moderate concentrazioni di arsenico nelle acque destinate al consumo umano (10-150 µg/l) in modo da ottenere una descrizione del quadro globale degli esiti che tale esposizione può avere sulla popolazione generale, e capire in quale direzione si sta muovendo il reperimento delle conoscenze. Gli articoli sono stati estratti da PubMed fino al 2013; sono stati esclusi sia quegli articoli che riportavano come misura dell'esposizione individuale la concentrazione di arsenico nelle urine e nel sangue, sia gli articoli che riportavano esposizioni a concentrazioni di arsenico nelle acque superiori a 150 µg/l.

Nelle tabelle il campo «esposizione» si riferisce all'esposizione dei soggetti all'arsenico nelle acque e il campo «Area in studio - conc. As» riporta la concentrazione di arsenico nelle acque dell'area dove è stato effettuato lo studio.

La rassegna è suddivisa in due sezioni: la prima relativa agli effetti cancerogeni, la seconda agli effetti non cancerogeni. All'interno di ogni sezione vi è una suddivisione in paragrafi relativi ai vari organi bersaglio. Alla fine di ogni paragrafo si riportano a confronto, se esistenti, i risultati degli studi di coorte prospettici effettuati sull'organo bersaglio in questione. Quando nel testo viene riportata la dizione «concentrazioni di arsenico» il riferimento è alle concentrazioni di arsenico nelle acque potabili.

EFFETTI CANCEROGENI

Cancro della pelle

Lo studio caso-controllo ASHRAM (Arsenic Health Risk Assessment and Molecular Epidemiology) condotto in Europa tra Ungheria, Romania e Slovacchia su 529 casi e 540 controlli, è il primo studio a riportare un'associazione tra il carcinoma basocellulare e l'esposizione a concentrazioni di arsenico inferiori a 50 µg/l.³⁰

Uno studio di coorte prospettico effettuato a Copenhagen, Danimarca, dove le concentrazioni medie di arsenico sono comprese tra 0,05 e 25,3 µg/l, non riscontra invece alcuna associazione tra l'esposizione ad arsenico e cancro del polmone, della vescica, dei reni, del fegato, della prostata, del colon-retto, melanoma della pelle.³¹ In particolare, gli autori osservano un'associazione inversa tra basse concentrazioni di arsenico nelle acque potabili e rischio di cancro della pelle, ma al contempo dichiarano di interpretare tale risultato con molta cautela.³¹

Cancro della vescica

Due studi caso-controllo condotti negli Stati Uniti non riportano alcuna associazione tra il rischio di cancro della vescica e l'esposizione a concentrazioni di arsenico comprese tra 10 e 50 µg/l³² e >10 µg/l.³³

Associazioni statisticamente significative tra concentrazioni di arsenico e cancro della vescica sono invece rilevate in uno studio ecologico in Argentina (concentrazioni di arsenico 40-178 µg/l)³⁴ e in uno studio caso-controllo in Finlandia (concentrazioni di arsenico >0,5 µg/l).³⁵

Nella zona nordorientale di Taiwan uno studio di coorte riporta un'associazione statisticamente significativa tra il carcinoma delle cellule transizionali (TCC) e concentrazioni di arsenico superiori a 100 µg/l² mentre un altro studio di coorte effettuato sulla stessa coorte ma con un periodo di follow-up più lungo riporta un rischio di TCC elevato ma non statisticamente significativo per il gruppo esposto a concentrazioni inferiori a 100 µg/l.³⁶

Cancro del polmone

In Belgio uno studio ecologico riporta un aumento di mortalità per cancro del polmone solo tra la popolazione maschile residente nei pressi di una fonderia di zinco (concentrazioni di arsenico 20-50 µg/l). Gli autori riportano che l'aumento di mortalità potrebbe essere dovuto o ad attività lavorative pregresse o al fumo di sigaretta.³⁷

Nello studio ecologico condotto da Lewis et al. nella Contea Millard si rilevano difetti di mortalità statisticamente significativi per il tumore del sistema respiratorio in entrambe i generi in un'area

dove le concentrazioni di arsenico sono comprese tra 14 e 166 µg/l,²⁰ facendo quasi pensare a un'esposizione protettiva.

In America Latina, uno studio ecologico condotto in Argentina riporta una relazione dose-risposta tra esposizione ad arsenico (40-178 µg/l) e cancro del polmone¹⁶ e uno studio caso-controllo condotto in Cile evidenzia un trend marcato per il cancro del polmone a crescenti concentrazioni di arsenico (da 10 a 50 µg/l).⁶

Uno studio ecologico in Idaho, invece, non riscontra alcun aumento di rischio di cancro del polmone per esposizioni a concentrazioni di arsenico <10 µg/l, ma solo un tasso di incidenza significativamente più elevato tra i maschi nelle contee con esposizioni a concentrazioni di arsenico comprese tra 2 e 10 µg/l e >10 µg/l e un tasso più elevato, ma non significativo, tra le femmine per le stesse classi di concentrazione.³⁸

Le evidenze finora riscontrate sono insufficienti per concludere che esiste un'associazione tra esposizioni a concentrazioni di arsenico <150 µg/l e cancro della pelle, della vescica e del polmone (tabella 1).

Area in studio - conc. As	Disegno	Risultati principali - Misura (IC 95%)	Esposizione (µg/l)	Rif.
CANCRO DELLA PELLE				
Ungheria, Romania, Slovacchia <100 µg/l	caso-controllo 529 casi, 540 controlli	OR=1,18 (1,08-1,28)	<50	[30]
Danimarca	coorte prospettico ('93-'97) 57.053 soggetti	IRR=0,88 (0,84-0,94) p=0,0004	0,05-25,3 vs <0,05	[31]
CANCRO DELLA VESCICA				
US 0,5-160 µg/l	caso-controllo	NESSUNA associazione	10-50 vs <10	[32]
US - Michigan 0-100 µg/l	caso-controllo 411 casi, 566 controlli	NESSUNA associazione	>10 vs <1	[33]
Argentina - Cordoba 100-2000 µg/l	ecologico 2.750.000 abitanti	SMR _M =0,80 (0,66-0,96); SMR _F =1,21 (0,85-1,64) SMR _M =1,42 (1,14-1,74); SMR _F =1,58 (1,01-2,35) SMR _M =2,14 (1,78-2,53); SMR _F =1,82 (1,19-2,64) P _{trendM} =0,001; P _{trendF} =0,04	Low vs <40 Medium vs <40 High vs 40	[34]
Finlandia <0,05-64 µg/l Mediana 0,14 µg/l	coorte (1967-1980) 61 casi, 275 soggetti riferim.	RR=1,53 (0,75-3,09) RR=2,44 (1,11-5,37)	0,1-0,5 vs <0,1 ≥0,5 vs <0,1	[35]
Taiwan nordorientale <0,15-3000 µg/l	coorte 8.086 soggetti	Carcinoma cellule transizionali (TCC) RR=1,9 (0,1-32,5) RR=8,2 (0,7-99,1) RR=15,3 (1,7-139,9) p <0,05	10,1-50 vs ≤10 50,1-100 vs ≤10 >100 vs ≤10	[2]
Taiwan nordorientale <0,15-3000 µg/L	coorte 8.086 soggetti	Ass. non signif. tra conc. As e TCC	<100 vs ≤10	[36]
CANCRO DEL POLMONE				
Belgio 20-50 µg/l	ecologico	SMR _M =1,05 (0,94-1,18)	20-50 vs <20	[37]
US - Millard County 3,5-620 µg/l	ecologico 2.203 soggetti	SMR _M =0,57 (0,38-0,82) SMR _F =0,44 (0,16-0,95) p <0,05	14-166 vs <14	[20]
Argentina 100-2.000 µg/l	ecologico 2.750.000 abitanti	SMR _M =0,92 (0,85-0,98) SMR _F =1,24 (1,06-1,42) SMR _M =1,54 (1,44-1,64) SMR _F =1,34 (1,12-1,58) SMR _M =1,77 (1,63-1,90) SMR _F =2,16 (1,83-2,52) P _{trendM} <0,001; P _{trendF} <0,001	Low vs <40 Medium vs <40 High vs >40	[16]
Cile fino a 860 µg/l (1958-1970) <40 µg/l nel 2000	caso-controllo 152 casi, 419 controlli	OR=1,6 (0,5-5,3) OR=3,9 (1,2-12,3)	10-29 vs <10 30-49 vs <10	[6]
US-Idaho 0,1-950 µg/l	ecologico 44 contee	IR _M =74,0 (71,2-76,8) vs IR _M =65,0 (61,7-68,4) IR _M =80,0 (75,5-84,8) vs IR _M =65,0 (61,7-68,4) IR _F =45,2 (43,2-47,2) vs IR _F =38,3 (36,0-40,8)	2-10 vs <2 ≥10 vs <2 2-10 vs <2	[38]
RR: Rischio relativo; OR: Odds Ratio; SMR: rapporto standardizzato di mortalità; M: maschi; F: femmine; TCC: carcinoma delle cellule transizionali; IR: tasso di incidenza; IRR: rapporto dei tassi di incidenza. RR: Relative Risk; OR: Odds Ratio; SMR: Standardized Mortality Ratio; M: males; F: females; TCC: Transitional Cell Carcinoma; IR: Incidence Rate; IRR: Incidence Rate Ratio.				

Tabella 1. Esposizioni a concentrazioni di As da basse a moderate in acque destinate al consumo umano e cancro.

Table 1. Exposure to low-to-moderate As concentrations in drinking water and cancer.

EFFETTI NON CANCEROGENI

Lesioni cutanee

Studi epidemiologici in diverse regioni del mondo hanno dimostrato una marcata associazione tra ingestione di arsenico inorganico a lungo termine e lesioni cutanee, di solito in forma di ipercheratosi, iperpigmentazione o ipopigmentazione. Osservazioni di lesioni della pelle in seguito a esposizione cronica a basse dosi di arsenico inorganico hanno suggerito che gli effetti sulla pelle possono fornire indicazioni sensibili rispetto agli effetti tossici da arsenico inorganico.³⁹

Nel Bengala occidentale uno studio trasversale su 7.683 soggetti riporta un'associazione tra esposizioni a concentrazioni di arsenico <100 µg/l e prevalenza di cheratosi e di iperpigmentazione in entrambi i generi.⁴⁰ Uno studio caso-controllo condotto su 504 casi e 2.201 controlli in Matlab, Bangladesh, riporta una relazione dose-risposta con un trend significativo ($p < 0,001$) tra l'esposizione media ad arsenico (10-150 µg/l) e lesioni cutanee, in entrambi i generi. I maschi presentano, comunque, un rischio più elevato per lesioni cutanee rispetto alle femmine.⁴¹ Sempre in Bangladesh, lo stesso gruppo di ricerca ha condotto uno studio ecologico di prevalenza tra 13.705 donne di età superiore ai 18 anni in 53 villaggi e uno studio caso-controllo su 176 coppie caso-controllo, sempre di sole donne. Lo studio ecologico riporta una bassa prevalenza di lesioni cutanee per esposizioni a concentrazioni medie di arsenico <5 µg/l e prevalenze più elevate per concentrazioni medie di arsenico tra 6 e 50 µg/l e >81 µg/l. Lo studio caso-controllo riporta un aumento della prevalenza di lesioni cutanee, pari a tre volte rispetto al riferimento, per esposizioni a concentrazioni di arsenico <50 µg/l ($p < 0,05$) e alcune indicazioni di un aumento di prevalenza per concentrazioni superiori a 10 µg/l.⁴²

Uno studio di coorte effettuato in Mongolia riporta una relazione dose-risposta tra l'esposizione ad arsenico e lesioni cutanee e un'elevata prevalenza tra i residenti esposti a concentrazioni di arsenico comprese tra 5 e 10 µg/l.⁴³

Lo studio di coorte prospettico HEALS (Health Effects of Arsenic Longitudinal Study) ha esaminato, nel periodo 2000-2002, 12.000 tra uomini e donne residenti ad Araihasar, Bangladesh, con lo scopo di studiare gli effetti sulla salute indotti da esposizioni a concentrazioni di arsenico da molto elevate a molto basse, utilizzando livelli individuali di esposizione.⁴⁴ I risultati di tale studio riportano un aumento di rischio di lesioni cutanee e un aumento dell'incidenza di lesioni cutanee in individui esposti a concentrazioni di arsenico <100 µg/l.⁴⁵⁻⁴⁷

A fronte delle evidenze riscontrate si rileva la possibile esistenza di un'associazione tra esposizioni a concentrazioni di arsenico <150 µg/l e lesioni cutanee come cheratosi e iperpigmentazione. Si osserva anche una bassa prevalenza di lesioni cutanee tra sole donne per concentrazioni di arsenico <5 µg/l e prevalenze più elevate per concentrazioni di arsenico comprese tra 6 e 50 µg/l e >81 µg/l. Un solo studio riporta una relazione dose-risposta tra esposizione a concentrazioni di arsenico comprese tra 5 e 10 µg/l e lesioni cutanee.

Gli studi di coorte prospettici riportano aumenti sia di rischio sia di incidenza di lesioni cutanee per esposizioni a concentrazioni di arsenico <100 µg/l (tabella 2).

Sistema cardiovascolare

Uno studio ecologico condotto su 30 contee negli Stati Uniti riporta SMR (*standardized mortality ratio*) statisticamente significativi per malattie delle arterie, delle arteriole e dei capillari per concentrazioni di arsenico >20 µg/l.⁴⁸ Un altro studio ecologico condotto cinque anni dopo non riscontra SMR statisticamente significativi ma eccessi di mortalità per tutte le malattie cardiache, ipertensive e ischemiche del cuore in entrambe i generi, per le malattie cerebrovascolari solo nei maschi e per tutte le altre malattie cardiache tra le sole femmine (concentrazioni di arsenico 14-166 µg/l).²⁰

Uno studio trasversale condotto in Wisconsin riporta un'associazione tra l'esposizione a concentrazioni di arsenico >10 µg/l e patologie cardiache come attacchi di cuore, elevata pressione sanguigna e problemi circolatori.⁴⁹

Un altro studio trasversale effettuato in Mongolia mostra un aumento nella prevalenza dell'ipertensione per una popolazione caratterizzata da un'esposizione a lungo termine (fino a più di 50 anni) a concentrazioni relativamente basse di arsenico (<50 µg/l).⁵⁰

Recentemente uno studio ecologico dimostra per la prima volta che l'esposizione a concentrazioni da basse a moderate di arsenico (>10 µg/l) aumenta l'iperreattività della pressione sanguigna indotta dallo stress, fattore di rischio per lo sviluppo dell'ipertensione.⁵¹

In Michigan uno studio ecologico riporta elevati tassi di mortalità per tutte le malattie del sistema circolatorio e per le malattie cerebrovascolari (concentrazione media di As 11 µg/l).⁵² Tali eccessi di mortalità si riscontrano anche nella sola Contea Genesee (concentrazione media di As 10,42 µg/l) dove si aggiunge anche l'eccesso per le malattie ischemiche.⁵² In Michigan e nella Contea Genesee, inoltre, i livelli di concentrazione di arsenico (0,94-3,75 µg/l) vengono associati all'ospedalizzazione per infarto.⁵³

In Spagna, in uno studio ecologico, concentrazioni di arsenico >10 µg/l vengono associate a un aumento della mortalità per malattie cardiovascolari e coronariche in entrambi i generi per concentrazioni di arsenico comprese tra 1 e 10 µg/l.⁵⁴

Uno studio trasversale condotto in Bangladesh associa l'esposizione a concentrazioni di arsenico comprese tra 23 e 32 µg/l a una elevata pressione del polso. Si osserva anche una relazione dose-risposta tra l'esposizione ad arsenico e l'aumento della pressione del polso, ma nessuna associazione tra l'esposizione cronica ad arsenico e l'ipertensione sistolica e diastolica o con l'ipertensione sistolica e diastolica prese singolarmente.⁵⁵

Nella zona nordorientale di Taiwan uno studio caso-controllo riporta una relazione dose-risposta tra concentrazioni di arsenico (10-50 µg/l; >50 µg/l) e aterosclerosi carotidee.⁵⁶

Per quanto riguarda gli studi di coorte prospettici, utilizzando i dati dello studio HEALS Chen et al. osservano una relazione dose-risposta tra concentrazioni di arsenico (<12-148 µg/l), malattie ischemiche del cuore e altre malattie cardiache.⁵⁷ In Texas uno studio dimostra che le patologie coronariche sono associate con l'aumento dell'esposizione a bassi livelli di arsenico nelle acque (massima concentrazione: 15,3 µg/l). Lo studio mette in evidenza che anche l'ipertensione è associata a una più elevata esposizione a basse concentrazioni di arsenico.⁵⁸ Lo studio di coorte prospettico «The Strong Heart Study» prende in esame tra il 1989 e il 1991 e fino al 2008, 3.575 indiani d'America di età tra i 45 e i 74 anni con lo scopo di valutare un'eventuale associazione tra l'esposizione a lungo termine

Area in studio - conc. As	Disegno	Risultati principali - Misura (IC95%)	Esposizione ($\mu\text{g/l}$)	Rif.
Bengala occidentale fino a 3.000 $\mu\text{g/l}$	trasversale 7.683 soggetti	Cheratosi $p < 0,001$ $PR_M = 1,5\%$ vs $PR_M = 0,2\%$ $PR_F = 0,4\%$ vs $PR_F = 0,0\%$ $PR_M = 1,6\%$ vs $PR_M = 0,2\%$ $PR_F = 1,2\%$ vs $PR_F = 0,0\%$ Iperpigmentosi $p < 0,001$ $PR_M = 3,2\%$ vs $PR_M = 0,4\%$ $PR_F = 0,8\%$ vs $PR_F = 0,3\%$ $PR_M = 11,0\%$ vs $PR_M = 0,4\%$ $PR_F = 5,7\%$ vs $PR_F = 0,3\%$	50-99 vs <50 100-149 vs <50 50-99 vs <50 100-149 vs <50	[40]
Bangladesh fino a 3.000 $\mu\text{g/l}$	caso-controllo 504 casi, 2.201 controlli	$OR_M = 3,25$ (1,43-7,38) $OR_F = 1,66$ (0,65-4,24) $OR_M = 2,28$ (1,04-4,98) $OR_F = 3,06$ (1,39-6,74) $p < 0,001$	10-49 vs <10 50-149 vs <10	[41]
Bangladesh fino a 3.000 $\mu\text{g/l}$	ecologico 13.705 donne	$PR = 0,37\%$ $PR = 0,63\%$ $PR = 6,84\%$	<5 6-50 81	[42]
	caso-controllo 176 coppie caso controllo	$OR = 1,33$ (0,77-2,28) $OR = 2,96$ (1,02-8,59)	11-50 vs 0-10 >51 vs 0-10	
Mongolia 0- ≥ 300 $\mu\text{g/l}$	coorte 11.416 soggetti	$PR = 3,80\%$ $OR = 2,52$ (1,47-4,30) $PR = 4,20\%$ $OR = 2,83$ (1,77-4,53) $PR = 6,90\%$ $OR = 3,94$ (2,78-5,59) $PR = 8,30\%$ $OR = 6,03$ (4,05-8,97) $(p_{\text{trend}} < 0,01)$	5,1-10 vs <5 10,1-20 vs <5 20,1-50 vs <5 50,1-100 vs <5	[43]
Bangladesh-Araihazar 0,3-864 $\mu\text{g/l}$	coorte prospettico (HEALS) 11.746 soggetti	$POR_M = 6,88$ (3,09-15,32) vs $POR_M = 3,61$ (1,79-7,28) $POR_F = 1,59$ (0,65-3,89) vs $POR_F = 1,00$ $POR_M = 11,30$ (5,11-24,99) vs $POR_M = 3,61$ (1,79-7,28) $POR_F = 2,82$ (1,20-6,61) vs $POR_F = 1,00$ $p < 0,05$	8,1-40 vs <0,1-8,0 40,1-90 vs <0,1-8,0	[45]
Bangladesh-Araihazar 0,3-864 $\mu\text{g/L}$	coorte prospettico (HEALS) 11.746 soggetti	$RR = 0,92$ (0,50-1,67) $RR = 1,27$ (0,73-2,20)	8-38 vs <8 39-94 vs <8	[46]
Bangladesh-Araihazar 0,3-864 $\mu\text{g/l}$	coorte prospettico (HEALS) 11.746 soggetti	$HR = 1,17$ (0,92-1,49) $HR = 1,69$ (1,33-2,14) $(p_{\text{trend}} = 0,0001)$	10,1-50 vs <10 50,1-100 vs <10	[47]

M: maschi; F: femmine; PR: tasso di prevalenza; OR: rapporto tra gli odds; POR: rapporto tra gli odds di prevalenza; RR: rischio relativo; HR: rapporto tra i rischi; HEALS: studio longitudinale sugli effetti sulla salute indotti da arsenico.
M: males; F: females; PR: Prevalence Rate; OR: Odds Ratio; POR: Prevalence Odds Ratio; RR: Relative Risk; HR: Hazard Ratio; HEALS: Health Effects of Arsenic Longitudinal Study.

Tabella 2. Esposizioni a concentrazioni di As da basse a moderate in acque destinate al consumo umano e lesioni cutanee.
Table 2. Exposure to low-to-moderate As concentrations in drinking water and cutaneous lesions.

a concentrazioni da basse a moderate di arsenico e le malattie cardiovascolari. Tale studio dimostra che esposizioni a lungo termine a concentrazioni di arsenico da basse a moderate sono associate all'incidenza e alla mortalità per malattie cardiovascolari.⁵⁹

Le evidenze sopra riportate portano ad affermare che esiste un'associazione tra l'esposizione a concentrazioni di arsenico comprese tra 0 e 50 $\mu\text{g/l}$ e: malattie del sistema cardiovascolare e cerebrovascolari; malattie delle arterie, delle arteriole e dei capillari; elevata pressione sanguigna e del polso; infarto e ospedalizzazione per infarto. Per concentrazioni di arsenico >50 $\mu\text{g/l}$ si riscontra un'associazione con l'aterosclerosi carotidea. Un solo studio riporta l'esistenza di un'associazione tra concentrazioni di arsenico >10 $\mu\text{g/l}$ e l'aumento dell'iperreattività della pressione del sangue indotta dallo stress.

Gli studi prospettici riportano una relazione dose-risposta tra concentrazioni di arsenico comprese tra 12 e 148 $\mu\text{g/l}$, malattie ischemiche e altre malattie cardiache, e un'associazione tra malattie coronariche e ipertensione e concentrazioni di arsenico comprese tra 2,2 e 15,3 $\mu\text{g/l}$ (tabella 3).

Diabete

Due studi ecologici condotti negli Stati Uniti calcolano gli SMR per il diabete mellito per entrambi i generi: lo studio condotto nella Contea di Millard su oltre 2.000 individui riporta SMR statisticamente non significativi²⁰ al contrario dello studio condotto in Michigan su 23 soggetti che riporta, invece, eccessi di mortalità per diabete sia sul complesso delle 6 contee sia per la sola Contea Genesee.⁵²

Quattro studi utilizzano i dati dello studio NHANES (National Health and Nutrition and Examination Survey), un'indagine epidemiologica trasversale condotta in continuo dai vari CDC (Centers for Disease Control) statunitensi che rileva le caratteristiche sanitarie e nutrizionali della popolazione generale nordamericana. Anche se tale studio rileva la quantità di arsenico nelle urine, i soggetti considerati sono però esposti a concentrazioni di arsenico da basse a moderate. Due dei quattro studi riscontrano la presenza di un'associazione tra l'arsenico totale nelle urine e la prevalenza di diabete mellito di tipo 2,^{60,61} gli altri due studi invece non riscontrano rischi per il diabete.^{62,63}

Area in studio - conc. As	Disegno	Risultati principali - Misura (IC95%)	Esposizione (µg/l)	Rif.
US - 30 contee 5,4-91,5 µg/l	ecologico	malattie delle arterie, delle arteriole e dei capillari SMR _M =1,6 (1,5-1,8) SMR _F =1,9 (1,7-2,1)	>20	[48]
US - Millard County 3,5-620 µg/l	ecologico 2.203 soggetti	patologie cerebrovascolari SMR _M =0,79 (0,62-0,99) tutte le patologie cardiache SMR _M =0,80 (0,73-0,88) SMR _F =0,81 (0,72-0,91) malattie ischemiche SMR _M =0,76 (0,67-0,85) SMR _F =0,64 (0,53-0,76) malattie ipertensive SMR _M =2,20 (1,36-3,36) SMR _F =1,73 (1,11-2,58) tutte le altre patologie cardiache SMR _F =1,43 (1,11-1,80)	14-166	[20]
US - Wisconsin 0-2.389 µg/l	trasversale 1.185 soggetti	attacchi di cuore OR=2,08 (1,10-4,31) elevata pressione sanguigna OR=1,68 (1,13-2,49) problemi circolatori OR=2,64 (1,17-5,95) p < 0,05	>10 vs <2	[49]
Mongolia - Contea Wuyuan <50 µg/l	trasversale 405 soggetti	per esposizioni di 30-50 anni vs <30 anni ipertensione OR=1,54 (0,63-3,35) PP anomala OR=1,06 (0,24-4,66) MAP anomala OR=0,87 (0,36-2,14) per esposizioni di oltre 50 anni vs <30 anni ipertensione OR=2,95 (1,31-6,67) PP anomala OR=2,46 (0,87-6,97) MAP anomala OR=3,75 (1,61-8,71)	<50	[50]
Romania - Contea di Arad 0,8-70,6 µg/l	ecologico 25 soggetti	maggiore probabilità di avere iperreattività pressoria con anticipatory stress (47,4 vs 12,5%; p=0,035) o con cold stress (73,7 vs 37,5%; p=0,044)	>10 vs <2	[51]
US - Michigan (6 contee + Genesee) 10-100 µg/l	ecologico 23 soggetti	sei contee (p < 0,01) tutte le malattie del sistema circolatorio SMR _M =1,11 (IC99%:1,09-1,13) SMR _F =1,15 (IC99%:1,13-1,17) contea Genesee (p < 0,01) tutte le malattie del sistema circolatorio SMR _M =1,14 (IC99%:1,12-1,17) SMR _F =1,16 (IC99%:1,14-1,19) malattie ischemiche SMR _M =1,05 (IC99%:1,02-1,08) SMR _F =1,16 (IC99%:1,02-1,08) malattie cerebrovascolari SMR _M =1,15 (IC99%:1,08-1,22) SMR _F =1,14 (IC99%:1,09-1,20)	media 11 mediana 7,58 media 10,42 mediana 8,48	[52]
US - Michigan 0-100 µg/l US - Michigan (Contea Genesee) 0-100 µg/l	ecologico 83 soggetti ecologico 23 soggetti	infarto RR=1,011 (1,002-1,019) p < 0,001 infarto RR=1,031 (1,011-1,051) p=0,002	0,94-3,75 mediana 1,83 2,00-15,3 mediana 7,78	[53]
Spagna <1-118 µg/l	ecologico 361.750 soggetti	malattie cardiovascolari p _{trend} =0,032 IM _R =2,2 (-0,9-5,5) IM _R =2,6 (-200-7,5) malattie coronariche p _{trend} =0,091 IM _R =5,2 (0,8-9,8) IM _R =1,5 (-4,5-7,9)	1-10 vs <1 >10 vs <1 1-10 vs <1 >10 vs <1	[54]
Bangladesh >50 µg/l	trasversale 1.682 soggetti	aumento di PP (p < 0,01) OR=3,87 (1,22-12,20) OR=4,32 (1,23-15,11)	23-32 vs 10-22 33-261 vs 10-22	[55]
Taiwan nordorientale oltre 3.000 µg/l	caso-controllo 863 soggetti	aterosclerosi (p _{trend} =0,04) OR=1,53 (0,67-3,50) OR=2,01 (1,05-3,85)	10,1-50,0 VS ≤10 >50,1 VS ≤10	[56]
Bangladesh - Araihaaz 0,3-864 µg/l	coorte (HEALS) 11.746 partecipanti	malattie ischemiche e altre malattie cardiache (p _{trend} =0,0019) HR=1,22 (0,65-2,32) HR=1,33 (0,71-2,57)	12,1-62,0 vs <12 62,1-148,0 vs <12	[57]
US - Texas conc. non riportata	coorte 499 soggetti	malattie coronariche OR=1,10 (1,00-1,21) p=0,0467 ipertensione OR=1,10 (1,03-1,17) p=0,0074	2,2-15,3 media 6,2	[58]
US - Arizona, Oklaoma e Sud Dakota da basse a moderate	coorte 3.575 partecipanti	HR=1,32 (1,09-1,59) malattie cardiovascolari HR=1,30 (1,04-1,62) malattie coronariche HR=1,47 (0,97-2,21) mortalità per infarto	>15,7 vs <5,8 µg/g creatinina	[59]

M: maschi; F: femmine; SMR: rapporto standardizzato di mortalità; OR: rapporto tra gli odds; RR: rischio relativo; PP: pressione sanguigna; MAP: pressione arteriosa; HR: rapporto tra i rischi; IMR: aumento del tasso di mortalità.
M: males; F: females; SMR: Standardized Mortality Ratio; OR: Odds Ratio; RR: Relative Risk; PP: Pulse Pressure; MAP: arterial blood pressure; HR: Hazard Ratio; IMR: Increased of Mortality Rates.

Tabella 3. Esposizioni a basse concentrazioni di As nelle acque destinate al consumo umano ed effetti sul sistema cardiovascolare.

Table 3. Exposure to low-to-moderate As concentrations in drinking water and effects on cardiovascular system.

Se si considera il Centro America, in Messico uno studio trasversale riporta un'associazione tra l'esposizione ad arsenico (media: 42,9 µg/l) e il diabete.⁶⁴

In Serbia un altro studio trasversale osserva *odds ratio* più elevati nella popolazione esposta ad arsenico (media: 56 µg/l) rispetto a quella non esposta (media: 2 µg/l) nel periodo 2006-2009.⁶⁵

Sono stati effettuati due studi di coorte prospettici: quello condotto in Bangladesh, che riprende i dati dello HEALS, non riporta alcuna associazione tra l'esposizione a moderate concentrazioni di arsenico (<100 µg/l) e diabete mellito⁶⁶ mentre l'altro, effettuato negli Stati Uniti, evidenzia, per concentrazioni pari a 15 µg/l, un'associazione statisticamente significativa tra l'esposizione ad arsenico e il rischio di diabete mellito.⁶⁷

A fronte di questi studi le evidenze sono insufficienti per concludere che il diabete negli individui esposti sia associato a concentrazioni di arsenico nell'acqua inferiori a 150 µg/l (**tabella 4**)⁶⁸.

Effetti respiratori

Lo studio ecologico condotto in Michigan su 23 soggetti riporta tassi di mortalità statisticamente significativi per tutte le malattie del sistema respiratorio solo tra i maschi, ma per malattie respiratorie croniche ostruttive in entrambi i sessi, nel complesso delle sei contee. Considerando solo la Contea Genesee si osservano gli

stessi eccessi ma con l'aggiunta dell'eccesso per malattie del sistema respiratorio anche per le femmine.⁵²

Nel 2010 viene effettuato uno studio ecologico nel Bengala occidentale per valutare gli effetti respiratori per diverse concentrazioni di arsenico nelle acque (≤50 µg/l, 50-150 µg/l, >150 µg/l). Lo studio mette in evidenza un aumento dell'insufficienza polmonare di tipo restrittivo all'aumentare delle concentrazioni di arsenico nelle acque solo tra i maschi.⁶⁹

Utilizzando i dati dello studio di coorte prospettico HEALS, Parvez et al. osservano un'associazione positiva tra l'esposizione ad arsenico e sintomi respiratori.⁷⁰ Si riscontrano effetti statisticamente significativi anche a dosi di arsenico comprese tra 7 e 40 µg/l, suggerendo quindi la possibilità che un'ampia parte della popolazione possa sviluppare malattie polmonari in un prossimo futuro.⁷⁰ I pochi studi a disposizione mettono in evidenza un'associazione tra esposizioni a concentrazioni di arsenico <150 µg/l, <100 µg/l per lo studio prospettico, ed effetti sul sistema respiratorio (**tabella 5**).

Eventi sfavorevoli della riproduzione

Secondo uno studio trasversale condotto in Bangladesh, le donne esposte a concentrazioni di arsenico maggiori di 50 µg/l sono 2,2 volte più soggette ad aborto spontaneo (p=0,008) e 2,5 volte più soggette ad avere bambini nati morti (p=0,046) rispetto alle donne espo-

Area in studio - conc. As	Disegno	Risultati principali - Misura (IC95%)	Esposizione (µg/l)	Rif.
US - Millard County 3,5-620 µg/l	ecologico 2.204 soggetti	SMR _M =0,79 (0,48-1,22) (ns) SMR _F =1,23 (0,86-1,71) (ns)	14-166 vs <14	[20]
US - Michigan (6 contee, compresa la Genesee) 10-100 µg/l	ecologico 23 soggetti	6 contee (p <0,01) SMR _M =1,28 (IC99%:1,18-1,37) SMR _F =1,27 (IC99%:1,19-1,35) Contea Genesee (p <0,01) SMR _M =1,20 (IC99%:1,18-1,43) SMR _F =1,28 (IC99%:1,17-1,38)	media 11 mediana 7,58 media 10,42 mediana 8,48	[52]
US	trasversale (NHANES 2003-2004) 788 partecipanti	OR=3,58 (1,18-10,83) p=0,03	18(≥P80) vs 3,5 (≤P20) nelle urine	[60]
US	trasversale (NHANES 2003-2006) 1.279 partecipanti	OR=2,6 (1,12-6,03)	7,4(≥P80) vs 1,6 (≤P20) nelle urine	[61]
US	trasversale (NHANES 2003-2006) 795 partecipanti	NESSUNA associazione OR=1,15 (0,53-2,50)	12(≥P80) vs 2,7 (≤P20) nelle urine non aggiustato per la creatinina	[62]
US	trasversale (NHANES) 280 partecipanti	NESSUNA associazione OR=1,03 (0,38-2,80)	(≥P80) vs (≤P20) nelle urine non aggiustato per la creatinina	[63]
Messico - Zimpana e Lagunera 3-215 µg/l media 42,9 µg/l	trasversale 258 soggetti	OR=1,13 (1,05-1,22) p <0,001	10	[64]
Serbia - Banato 1.349 µg/l	trasversale 95.325 esposti 650.877 non esposti	OR più elevate nella popolazione esposta rispetto a quella non esposta	media 56 (esposti) media 2 (non esposti)	[65]
Bangladesh - Araihasar 0-864 µg/l	coorte (HEALS) 11.319 partecipanti	NESSUNA associazione OR=1,35 (0,90-2,02) OR=1,24 (0,82-1,87)	8-41(Q2) vs 0,1-8(Q1) 41-92(Q3) vs 0,1-8(Q1)	[66]
US - Saint Louis Valley 0-752 µg/l media 39 µg/l	coorte 141 soggetti	HR=1,27 (1,01-1,59) p=0,07	15	[67]

M: maschi; F: femmine; SMR: rapporto standardizzato di mortalità; HR: rapporto tra i rischi; OR: rapporto tra gli odds; ns: non statisticamente significativo.
M: males; F: females; SMR: Standardized Mortality Ratio; HR: Hazard Ratio; OR: Odds Ratio; ns: not statistically significant.

Tabella 4. Esposizioni a basse concentrazioni di As nelle acque destinate al consumo umano e diabete.

Table 4. Exposure to low-to-moderate As concentrations in drinking water and diabetes.

Area in studio - conc. As	Disegno	Risultati principali - Misura (IC95%)	Esposizione (µg/l)	Rif.
US - Michigan (6 contee, compresa la Genesee) 0-100 µg/l	ecologico 23 soggetti	6 contee (p <0,01) malattie del sistema respiratorio SMR _M =1,05 (IC99%:1,01-1,09) malattie cronico-ostruttive SMR _M =1,16 (IC99%:1,09-1,24) SMR _F =1,14 (IC99%:1,05-1,23) Contea Genesee (p <0,01) malattie del sistema respiratorio SMR _M =1,08 (IC99%:1,03-1,14) SMR _F =1,11 (IC99%:1,05-1,17) malattie croniche ostruttive SMR _M =1,23 (IC99%:1,14-1,34) SMR _F =1,27 (IC99%:1,16-1,40)	media 11 mediana 7,58 media 10,42 mediana 8,48	[52]
Bengala occidentale fino a 3.000 µg/l	ecologico 112 soggetti	insufficienza polmonare di tipo restrittivo PR _M =15,78% PR _F =4,54% PR _M =29,41% PR _F =5,00%	≤50 50-150	[69]
Bangladesh - Araihaazar 0,3-864 µg/l	coorte (HEALS) 11.746 soggetti	effetti respiratori HR=1,27 (1,09-1,48) HR=1,39 (1,19-1,63) HR=1,43 (1,23-1,68)	7-40 vs ≤7 40-90 vs ≤7 90-178 vs ≤7	[70]

M: maschi; F: femmine; SMR: rapporto standardizzato di mortalità; PR: tasso di prevalenza; HR: rapporto tra i rischi.
M: males; F: females; SMR: Standardized Mortality Ratio; PR: Prevalence Rate; HR: Hazard Ratio.

Tabella 5. Esposizione a basse concentrazioni di As nelle acque destinate al consumo umano ed effetti sul sistema respiratorio.

Table 5. Exposure to low-to-moderate As concentrations in drinking water and effects on respiratory system.

ste a concentrazioni di arsenico <20 µg/l.⁷¹ Anche in un altro studio di prevalenza l'aumento degli aborti spontanei, dei nati morti e delle morti neonatali è associato alla dose e alla durata dell'esposizione ad arsenico.⁷² Lo studio riporta, infatti, un aumento degli *odds* di 2,5 volte sia per gli aborti spontanei sia per i nati morti per esposizioni ad arsenico ≥50 µg/l rispetto a esposizioni <50 µg/l.⁷²

Uno studio ecologico riscontra un aumento del tasso di prevalenza di nati morti tra le donne esposte a concentrazioni di arsenico comprese tra 10 e 50 µg/l rispetto a concentrazioni <10 µg/l e a concentrazioni di arsenico ≥50 µg/l rispetto a concentrazioni <10 µg/l.⁷³

Uno studio trasversale riporta un incremento degli *odds*, anche se non statisticamente significativo, per l'aborto spontaneo tra 224 donne mongole che risiedono in villaggi con concentrazioni di arsenico >50 µg/l, rispetto a 99 donne che risiedono in villaggi con concentrazioni di arsenico <50 µg/l e un incremento statisticamente significativo del rischio di aborto spontaneo tra le donne che presentano dermatosi da arsenico rispetto alle donne che risiedono in villaggi con concentrazioni di arsenico <50 µg/l.⁷⁴

Un altro studio di prevalenza sempre condotto in Mongolia riporta un'associazione tra concentrazioni di arsenico >50 µg/l e aumento del rischio di morte neonatale.⁷⁵

Solo uno studio epidemiologico caso-controllo condotto in Massachusetts prende in considerazione una popolazione esposta principalmente a concentrazioni di arsenico <10 µg/l.⁷⁶ Tra 286 casi di aborti spontanei, si osserva un aumento degli *odds* per le donne esposte a un range di concentrazione di arsenico di 0,8-1,3 µg/l o di 1,4-1,9 µg/l rispetto a donne esposte a concentrazioni di arsenico <0,8 µg/l.

Uno studio di coorte prospettico riporta un aumento del rischio di interruzioni spontanee di gravidanza del 14% tra le donne esposte a concentrazioni di arsenico >50 µg/l rispetto a quelle esposte a concentrazioni di arsenico <50 µg/l.⁷⁷

A fronte delle evidenze sopra riportate si osserva un'associazione tra esposizioni ad arsenico >50 µg/l ed effetti sulla riproduzione, prin-

cipalmente aborto spontaneo e morte neonatale. Solo lo studio caso-controllo, effettuato nel 1989, riporta un'associazione tra aborto spontaneo e concentrazioni di arsenico <10 µg/l (tabella 6).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

L'insieme delle evidenze su esposizioni a concentrazioni da basse a moderate di arsenico nelle acque potabili (0-150 µg/l), non è dimostrativo di un'associazione con il cancro della pelle, della vescica e del sistema respiratorio.

Per quanto riguarda invece gli effetti non cancerogeni, le evidenze riportano associazioni tra esposizioni a concentrazioni di arsenico <150 µg/l e lesioni cutanee.

Per quanto concerne invece le malattie cardiovascolari, gli studi riportati mettono in evidenza qualche associazione tra concentrazioni di arsenico comprese tra 0 e 50 µg/l e le malattie del sistema cardiovascolare, le malattie cerebrovascolari e l'infarto e tra concentrazioni di arsenico >50 µg/l e l'aterosclerosi carotidea, anche se, nel complesso, viste le limitazioni metodologiche di tali studi discusse nell'introduzione, le evidenze sono insufficienti per affermare l'esistenza di un'associazione tra patologie cardiovascolari e concentrazioni relativamente basse di arsenico nelle acque.⁷⁸

Si osservano anche associazioni tra esposizioni a concentrazioni >50 µg/l e aborti spontanei e nati morti; solo uno studio riporta un'associazione tra gli stessi outcome e concentrazioni di arsenico <10 µg/l. I pochi studi disponibili riportano associazioni tra esposizioni a concentrazioni di arsenico <150 µg/l ed effetti sul sistema respiratorio.

Le evidenze sono invece insufficienti per concludere che vi sia una qualche associazione tra diabete ed esposizione a concentrazioni di arsenico <150 µg/l.

A fronte della finalità di questa rassegna, cioè quella di mirare all'identificazione di una direzione delle prove fino a oggi acquisite, il limite principale è legato alla rilevante eterogeneità degli studi presi in esame, la maggior parte dei quali non era dedicata in modo

Area in studio - conc. As	Disegno	Risultati principali - Misura (IC95%)	Esposizione ($\mu\text{g/l}$)	Rif.
Bangladesh fino a 1.371 $\mu\text{g/l}$	trasversale 192 donne	aborto spontaneo OR=2,2 p=0,008 nati morti OR=2,5 p=0,046	>50 vs \leq 20	[71]
Bangladesh fino a 1.710 $\mu\text{g/l}$	trasversale 533 donne	aborto spontaneo OR=2,5 (1,5-4,3) nati morti OR=2,5 (1,3-4,9) morte neonatale OR=1,8 (0,9-3,5)	\geq 50 vs <50	[72]
Bangladesh concentrazione As nell'area non definita	ecologico 30.984 gravidanze ed esiti	nati morti OR=1,23 (0,87-1,74) OR=1,80(1,14-2,86)	10-50 vs <10 \geq 50 vs <10	[73]
Mongolia	trasversale 431 residenti	aborto spontaneo (villaggi contaminati da As vs villaggi non contaminati da As) OR=2,7 (0,8-8,4) vs OR=1,7 (0,5-6,1) Aborto spontaneo (soggetti con dermatosi vs villaggi non contaminati da As) OR=3,8 (1,2-12,7) vs OR=1,7 (0,5-6,1)	>50 vs <50	[74]
Mongolia	trasversale 9.890 parti	morte neonatale OR=2,01 (1,12-3,59)	>50 vs <50	[75]
US - Massachusetts	caso-controllo 286 casi 1.391 controlli	aborto spontaneo OR=1,1 (0,6-1,8) OR=1,5 (0,4-4,7)	0,8-1,3 vs <0,8 1,4-1,9 vs <0,8	[76]
Bangladesh	coorte 29.134 gravidanze	interruzioni spontanee di gravidanza RR=1,14 (1,04-1,25)	>50 vs <50	[77]

OR: rapporto tra gli odds; RR: rischio relativo; ns: non statisticamente significativo.
OR: Odds Ratio; RR: Relative Risk; ns: not statistically significant.

Tabella 6. Esposizione a basse concentrazioni di As nelle acque destinate al consumo umano ed effetti avversi della riproduzione.

Table 6. Exposure to low-to-moderate As concentrations in drinking water and adverse reproductive effects.

specifico alle basse concentrazioni, o non faceva riferimento alla concentrazione di arsenico nelle acque. Questo elemento ha comportato una evidente difficoltà nello svolgere un confronto standardizzato e di ciò ha indubbiamente risentito il giudizio sui limiti del complesso di questi studi.

A fronte delle limitazioni sopra descritte e riportate anche nell'introduzione, riguardanti soprattutto gli studi epidemiologici che non valutano l'esposizione individuale all'arsenico, vi è comunque una discreta coerenza tra i vari studi per quanto riguarda l'interazione positiva tra esposizione ad arsenico e i vari outcome descritti.

Inoltre, nonostante l'eterogeneità delle evidenze riscontrate, la totalità degli studi concorda sulla necessità di effettuare studi di coorte prospettici che prevedano una valutazione dell'esposizione di tipo individuale in modo da poter stabilire la causalità delle associazioni evidenziate.

E' quindi necessario uno sforzo per stimare in modo accurato l'esposizione pregressa ad arsenico a livello individuale attraverso studi statistici robusti e con grande numerosità con lo scopo di ottenere risultati scientifici affidabili da parte degli operatori di sanità pubblica.

Bibliografia/References

- IARC (2012). Arsenic and arsenic compounds. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum; 100C: 41-93.
- Chiou HY, Chiou ST, Hsu YH, Chou YL, Tseng CH, Wei ML, Chen CJ. Incidence of transitional cell carcinoma and arsenic in drinking water: a follow-up study of 8102 residents in an arseniasis-endemic area in northeastern Taiwan. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 411-418.
- Bates MN, Rey OA, Biggs ML, Hopenhayn C, Moore LE, Kalman D, Steinamus C, Smith A. Case-control study of bladder cancer and exposure to arsenic in Argentina. *Am J Epidemiol* 2004; 159: 381-389.
- Chen Y, Ahsan H. Cancer burden of arsenic in drinking water in Bangladesh. *Am J Public Health* 2004; 94: 741-744.
- Marshall G, Ferreccio C, Yuan Y, Bates MN, Steinmaus C, Selvin S, Liaw J, Smith AH. Fifty-year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 920-928.
- Ferreccio C, Gonzalez C, Milosavljevic V, Marshall G, Sancha AM, Smith AH. Lung cancer and arsenic concentrations in drinking water in Chile. *Epidemiology* 2000; 11: 673-679.
- Nakadaira H, Endoh K, Katagiri M, Yamamoto M. Elevated mortality from lung cancer associated with arsenic exposure for a limited duration. *J Occup Environ Med* 2002; 44: 291-299.
- Chen CL, Hsu LI, Chiou HY, Hsueh YM, Chen SY, Wu MM, Chen CJ. Ingested arsenic, cigarette smoking and lung cancer risk: a follow-up study in arseniasis-endemic areas in Taiwan. *JAMA* 2004; 292(24): 2984-2990.
- Chiu HF, Ho SC, Yang CY. Lung cancer mortality reduction after installation of tap-water supply system in an arseniasis-endemic area in Southwestern Taiwan. *Lung Cancer* 2004; 46: 265-270.
- Guo HR. Arsenic level in drinking water and mortality of lung cancer (Taiwan). *Cancer Causes Control* 2004; 15: 171-177.
- Heck JE, Andrew AS, Onega T, Rigas JR, Jackson BP, Karagas MR, Duell EJ. Lung cancer in a U.S population with low to moderate arsenic exposure. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 1718-1723.
- Chen CL, Chiou HY, Hsu LI, Hsueh YM, Wu MM, Chen CJ. Ingested arsenic, characteristics of well water consumption and risk of different histological types of lung cancer in northeastern Taiwan. *Environ Res* 2010; 110: 455-462.
- Tseng WP. Effects and dose response relationships of skin cancer and blackfoot disease with arsenic. *Environ Health Perspect* 1977; 19: 109-119.
- Chen CJ, Chuang YC, Lin TM, Wu HY. Malignant neoplasms among residents of a blackfoot disease-endemic area in Taiwan: high arsenic artesian well water and cancers. *Cancer Res* 1985; 45: 5895-5899.
- Tsuda T, Babazono A, Yamamoto E, Kurumatani N, Mino Y, Ogawa T, Kishi Y,

- Aoyama H. Ingested arsenic and internal cancer: a historical cohort study followed for 33 years. *Am J Epidemiol* 1995; 141: 198-209.
16. Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Smith AH. Lung and kidney cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Córdoba, Argentina. *Int J Epidemiol* 1998; 27: 561-569.
 17. Chen CJ, Wu MM, Lee SS, Wang JD, Cheng SH, Wu HY. Etherogenicity and carcinogenicity of high-arsenic artesian well water. Multiple risk factors and related malignant neoplasms of blackfoot disease. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 452-460.
 18. Wu MM, Kuo TL, Hwang YH, Chen CJ. Dose-response relation between arsenic concentration in well water and mortality from cancers and vascular diseases. *Am J Epidemiol* 1989; 130:1123-1132.
 19. Chen CJ, Wang CJ. Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms. *Cancer Res* 1990; 50: 5470-5474.
 20. Lewis DR, Southwick JW, Ouellet-Hellstrom R, Rensch J, Calderon RJ. Drinking water arsenic in Utah: a cohort mortality study. *Environ Health Perspect* 1999; 107: 359-365.
 21. Tsai SM, Wang TN, Ko YC. Mortality for certain diseases in areas with high levels of arsenic in drinking water. *Arch Environ Health* 1999; 54: 186-193.
 22. Yuan Y, Marshall G, Ferreccio C, Steinmaus C, Liaw J, Bates M, Smith AH. Kidney cancer mortality: fifty-year latency patterns related to arsenic exposure. *Epidemiology* 2004; 21: 103-108.
 23. Liaw J, Marshall G, Yuan Y, Ferreccio C, Steinmaus C, Smith AH. Increased childhood liver cancer mortality and arsenic in drinking water in Northern Chile. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 1982-1987.
 24. Wadhwa SK, Kazi TG, Chandio AA, Afridi HI, Kolachi NF, Khan S, Kandhro GA, Nasreen S, Shah AQ, Baig JA. Comparative study of liver cancer patients in arsenic exposed and non-exposed areas of Pakistan. *Biol Trace Elem Res* 2011; 144: 86-96.
 25. Navas-Acien A, Sharrett AR, Silbergeld EK, Schwartz BS, Nachman KE, Burke TA, Guallar E. Arsenic exposure and cardiovascular disease: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Am J Epidemiol* 2005; 162(11): 1037-1049.
 26. Navas-Acien A, Silbergeld EK, Stretter RA, Clark JM, Burke TA, Guallar E. Arsenic exposure and type 2 diabetes: a systematic review of the experimental and epidemiological evidence. *Environ Health Perspect* 2006; 114(5): 641-648.
 27. National Research Council (NRC). *Arsenic in Drinking Water*. Washington, DC: National Academy of Sciences Press; 1999.
 28. WHO 2011. *Arsenic in drinking water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality*.
 29. Cantor KP, Lubin JH. Arsenic, internal cancers, and issues in inference from studies of low-level exposures in human populations. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 222(3): 252-257.
 30. Leonardi G, Vahter M, Clemens F, Goessler W, Gurzau E, Hemminki K, Hough R, Koppova K, Kumar R, Rudnai P, Surdu S, Fletcher T. Inorganic arsenic and basal cell carcinoma in areas of Hungary, Romania, and Slovakia: a case-control study. *Environ Health Perspect* 2012; 120(5): 721-726.
 31. Bastrup R, Sørensen M, Balstrøm T, Frederiksen K, Larsen CL, Tjønneland A, Overvad K, Raaschou-Nielsen O. Arsenic in drinking-water and risk for cancer in Denmark. *Environ Health Perspect* 2008; 116(2): 231-237.
 32. Bates MN, Smith AH, Cantor KP. Case-control study of bladder cancer and arsenic in drinking water. *Am J Epidemiol* 1995; 141(6): 523-530.
 33. Meliker JR, Slotnick MJ, AvRuskin GA, Schottenfeld D, Jacquez GM, Wilson ML, Goovaerts P, Franzblau A, Nriagu JO. Lifetime arsenic exposure in drinking water and bladder cancer: a population-based case-control study in Michigan, USA. *Cancer Causes Control* 2010; 21: 745-757.
 34. Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Fuchs A, Bergoglio R, Tello EE, Nicolli H, Smith AH. Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Argentina. *Epidemiology* 1996; 7(2): 117-124.
 35. Kurttio P, Pukkala E, Kahelin A, Auvinen A, Pekkanen J. Arsenic concentrations in well water and risk of bladder and kidney cancer in Finland. *Environ Health Perspect* 1999; 107: 705-710.
 36. Chen CL, Chiou HY, Hsu LI, Hsueh YM, Wu MM, Wang YH, Chen CJ. Arsenic in drinking water and risk of urinary tract cancer: a follow-up study from North-eastern Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; 19: 101-110.
 37. Buchet JP, Lison D. Mortality by cancer in groups of the Belgian population with a moderately increased intake of arsenic. *Int Arch Occup Environ Health* 1998; 71(2): 125-30.
 38. Han YY, Weissfeld JL, Davis DL, Talbott EO. Arsenic levels in ground water and cancer incidence in Idaho: an ecologic study. *Int Arch Occup Environ Health* 2009; 82(7): 843-849.
 39. WHO/FAO (2011) *Safety evaluation of certain contaminants in food. WHO Food Additives. Series N° 63. FAO JECFA Monograph 8*.
 40. Guha Mazumder DN, Haque R, Ghosh N, De BK, Santra A, Chakraborty D, Smith AH. Arsenic levels in drinking water and the prevalence of skin lesions in West Bengal, India. *Int J Epidemiol* 1998; 27(5): 871-877.
 41. Rahman M, Vahter M, Sohel N, Yunus M, Wahed MA, Streatfield PK, Ekström EC, Persson LA. Arsenic exposure and age and sex-specific risk for skin lesions: a population-based case-referent study in Bangladesh. *Environ Health Perspect* 2006; 114(12): 1847-1852.
 42. McDonald C, Hoque R, Huda N, Cherry N. Risk of arsenic-related skin lesions in Bangladeshi villages at relatively low exposure: a report from Gonoshasthaya Kendra. *Bull World Health Organ* 2007; 85(9): 668-673.
 43. Xia Y, Wade TJ, Wu K, Li Y, Ning Z, Le XC, He X, Chen B, Feng Y, Mumford JL. Well water arsenic exposure, arsenic induced skin-lesions and self-reported morbidity in Inner Mongolia. *Int J Environ Res Public Health* 2009; 6(3): 1010-1025.
 44. Ahsan H, Chen Y, Parvez F, Argos M, Hussain AI, Momotaj H, Levy D, van Geen A, Howe G, Graziano J. Health Effects of Arsenic Longitudinal Study (HEALS): description of a multidisciplinary epidemiologic investigation. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2006; 16(2): 191-205.
 45. Ahsan H, Chen Y, Parvez F, Zablotska L, Argos M, Hussain I, Momotaj H, Levy D, Cheng Z, Slavkovich V, van Geen A, Howe GR, Graziano JH. Arsenic exposure from drinking water and risk of premalignant skin lesions in Bangladesh: baseline results from the Health Effects of Arsenic Longitudinal Study. *Am J Epidemiol* 2006; 163: 1138-1148.
 46. Hall M, Chen Y, Ahsan H, Slavkovich V, van Geen A, Parvez F, Graziano JH. Blood arsenic as a biomarker of arsenic exposure: results from a prospective study. *Toxicology* 2006; 225: 225-233.
 47. Argos M, Kalra T, Pierce BL, Chen Y, Parvez F, Islam T, Ahmed A, Hasan R, Hasan K, Sarwar G, Levy D, Slavkovich V, Graziano JH, Rathouz PJ, Ahsan H. A prospective study of arsenic exposure from drinking water and incidence of skin lesions in Bangladesh. *Am J Epidemiol* 2011; 174(2): 185-194.
 48. Engel RR, Smith AH. Arsenic in drinking water and mortality from vascular disease: an ecologic analysis in 30 counties in the United States. *Arch Environ Health* 1994; 49(5): 418-427.
 49. Zierold KM, Knobeloch L, Anderson H. Prevalence of chronic diseases in adults exposed to arsenic-contaminated drinking water. *Am J Public Health* 2004; 94(11): 1936-1937.
 50. Zhang C, Mao G, He S, Yang Z, Yang W, Zhang X, Qiu W, Ta N, Cao L, Yang H, Guo X. Relationship between long-term exposure to low-level arsenic in drinking water and the prevalence of abnormal blood pressure. *J Hazard Mater* 2012. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.09.045.
 51. Kunrath J, Gurzau E, Gurzau E, Goessler W, Gelmann ER, Thach TT, Mccarty KM, Yeckel CW. Blood pressure hyperreactivity: an early cardiovascular risk in normotensive men exposed to low-to-moderate inorganic arsenic in drinking water. *J Hypertens* 2013; 31(2): 361-369.
 52. Meliker JR, Wahl RL, Cameron LL, Nriagu JO. Arsenic in drinking water and cerebrovascular disease, diabetes mellitus, and kidney disease in Michigan: a standardized mortality ratio analysis. *Environmental Health* 2007; 6: 4.
 53. Lisabeth LD, Ahn HJ, Chen JJ, Sealy-Jefferson S, Burke JF, Meliker JR. Arsenic in Drinking Water and Stroke Hospitalizations in Michigan. *Stroke* 2010; 41: 2499-2504.
 54. Medrano MJ, Boix R, Barriuso RP, Palau M, Damia'n J, Ramis R, delBarrio JL, Navas-Acien A. Arsenic in public water supplies and cardiovascular mortality in Spain. *Environmental Research* 2010; 110: 448-454.
 55. Islam MR, Khan I, Attia J, Hassan SM, McEvoy M, D'Este C, Azim S, Akhter A, Akter S, Shahidullah SM, Milton AH. Association between hypertension and chronic arsenic exposure in drinking water: a cross-sectional study in Bangladesh. *Int J Environ Res Public Health* 2012; 9(12): 4522-4536.
 56. Hsieh YC, Lien LM, Chung WT, Hsieh FI, Hsieh PF, Wu MM, Tseng HP, Chiou HY, Chen CJ. Significantly increased risk of carotid atherosclerosis with arsenic exposure and polymorphisms in arsenic metabolism genes. *Environ Res* 2011; 111(6): 804-810.
 57. Chen Y, Graziano JH, Parvez F, Liu M, Slavkovich V, Kalra T, Argos M, Islam T, Ahmed A, Rakibuz-Zaman M, Hasan R, Sarwar G, Levy D, van Geen A, Ahsan

- H. Arsenic exposure from drinking water and mortality from cardiovascular disease in Bangladesh: prospective cohort study. *BMJ* 2011; 342: d2431.
58. Gong G, O'Bryant E. Low-level arsenic exposure, AS3MT genepolymorphism and cardiovascular diseases in rural Texas counties. *Environ Res* 2012; 113: 52-57.
 59. Moon KA, Guallar E, Umans JG, Devereux RB, Best LG, Francesconi KA, Goessler W, Pollak J, Silbergeld EK, Howard BV, Navas-Acien A. Association between exposure to low to moderate arsenic level and incident cardiovascular disease: a prospective cohort study. *Ann Intern Med* 2013. doi:10.7326/0003-4819-159-10-2012311190-00719
 60. Navas-Acien A, Silbergeld EK, Pastor-Barriuso R, Guallar E. Arsenic exposure and prevalence of type 2 diabetes in US adults. *JAMA* 2008;300(7): 814-822.
 61. Navas-Acien A, Silbergeld EK, Pastor-Barriuso R, Guallar E. Rejoinder. Arsenic exposure and prevalence of type 2 diabetes: updated findings from the National Health Nutrition and Examination Survey, 2003-2006. (rejoinder). *Epidemiology* 2009; 20(6): 816-820.
 62. Steinmaus C, Yuan Y, Liaw J, Smith AH. Low-level population exposure to inorganic arsenic in the United States and diabetes mellitus: a reanalysis. *Epidemiology* 2009; 20(6): 807-815.
 63. Steinmaus C, Yuan Y, Liaw J, Smith AH. On arsenic, diabetes, creatinine, and multiple regression modeling: a response to the commentaries on our reanalysis. *Epidemiology* 2009; 20(6): e1-e2.
 64. Del Razo LM, García-Vargas GG, Valenzuela OL, Castellanos EH, Sánchez-Peña LC, Currier JM, Drobná Z, Loomis D, Stýblo M. Exposure to arsenic in drinking water is associated with increased prevalence of diabetes: a cross-sectional study in the Zimapán and Lagunera regions in Mexico. *Environ Health* 2011; 10: 73.
 65. Jovanović D, Rasić-Milutinović Z, Paunović K, Jakovljević B, Plavšić S, Milosević J. Low levels of arsenic in drinking water and type 2 diabetes in Middle Banat region, Serbia. *Int J Hyg Environ Health* 2013; 216(1): 50-55.
 66. Chen Y, Ahsan H, Slavkovich V, Peltier GL, Gluskin RT, Parvez F, Liu X, Graziano JH. No association between arsenic exposure from drinking water and diabetes mellitus: a cross-sectional study in Bangladesh. *Environ Health Perspect* 2010; 118(9): 1299-1305.
 67. James KA, Marshall JA, Hokanson JE, Meliker JR, Zerbe GO, Byers TE. A case-cohort study examining lifetime exposure to inorganic arsenic in drinking water and diabetes mellitus. *Environ Res*. 2013; 123: 33-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2013.02.005>
 68. Maull EA, Ahsan H, Edwards J, Longnecker MP, Navas-Acien A, Pi J, Silbergeld EK, Styblo M, Tseng CH, Thayer KA, Loomis D. Evaluation of the association between arsenic and diabetes: a National Toxicology Program workshop review. *Environ Health Perspect* 2012; 120(12): 1658-1670.
 69. Chattopadhyay BP, Mukherjee AK, Gangopadhyay PK, Alam J, Roychowdhury A. Respiratory effect related to exposure of different concentrations of arsenic in drinking water in West Bengal, India. *J Environ Sci Eng* 2010; 52(2): 147-154.
 70. Parvez F, Chen Y, Brandt-Rauf PW, Slavkovich V, Islam T, Ahmed A, Argos M, Hassan R, Yunus M, Haque SE, Balac O, Graziano JH, Ahsan H. A prospective study of respiratory symptoms associated with chronic arsenic exposure in Bangladesh: findings from the Health Effects of Arsenic Longitudinal Study (HEALS). *Thorax* 2010; 65(6): 528-533.
 71. Ahmad SA, Salim Ullah Sayed MH, Barua S, Haque Khan M, Faruquee MH, Jalil A, Abdul Hadi S, Kabir Talukder H. Arsenic in drinking water and pregnancy outcomes. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 629-631.
 72. Milton AH, Smith W, Rahman B, Hasan Z, Kulsum U, Dear K, Rakibuddin M, Ali A. Chronic arsenic exposure and adverse pregnancy outcomes in Bangladesh. *Epidemiology* 2005; 16: 82-86.
 73. Cherry N, Shaik K, McDonald C, Chowdhury Z. Stillbirth in rural Bangladesh: arsenic exposure and other etiological factors: a report from Gonoshasthaya Kendra. *Bull World Health Organ* 2008; 86: 172-177.
 74. Guo X, Fujino Y, Chagi J, Wu K, Xia Y, Li Y, Sun Z, Yoshimura T. The prevalence of subjective symptoms after exposure to arsenic in drinking water in Inner Mongolia, China. *J Epidemiol* 2003; 211-215.
 75. Myers SL, Lobdell DT, Liu Z, Xia Y, Ren H, Li Y, Kwok RK, Mumford JL, Mendola P. Maternal drinking water arsenic exposure and perinatal outcomes in inner Mongolia, China. *J Epidemiol Community Health* 2010; 64(4): 325-329. doi: 10.1136/jech.2008.084392
 76. Aschengrau A, Zierler S, Cohen A. Quality of community drinking water and the occurrence of spontaneous abortion. *Arch Environ Health* 1989; 44: 283-290.
 77. Rahman A, Vahter M, Ekstrom EC, Rahman M, Golam Mustafa AHM, Wahed MA, Yunus M, Persson LÅ. Association of arsenic exposure during pregnancy with fetal loss and infant death: a cohort study in Bangladesh. *Am J Epidemiol* 2007; 165: 1389-1396.
 78. Moon K, Guallar E, Navas-Acien A. Arsenic exposure and cardiovascular disease: an updated systematic review. *Curr Atheroscler Rep* 2012; 14(6): 542-555. doi: 10.1007/s11883-012-0280-x

PARTE II

Sorveglianza epidemiologica in aree interessate da inquinamento ambientale da arsenico di origine naturale o antropica (SEpiAs CCM 2010)

Epidemiological surveillance in areas with environmental pollution by natural or anthropogenic arsenic

eap

Sorveglianza epidemiologica in aree interessate da inquinamento ambientale da arsenico di origine naturale o antropica (SEpiAs CCM 2010)

Epidemiological surveillance in areas with environmental pollution by natural or anthropogenic arsenic

Elisa Bustaffa,¹ Fabrizio Minichilli,¹ Maria Grazia Andreassi,² Simona Carone,³ Alessio Coi,¹ Liliana Cori,¹ Francesca Faita,² Francesco Faita,⁴ Sabina Grecchi,⁵ Claudio Minoia,⁶ Anna Ronchi,⁶ Ivana Scovassi,⁵ Rosa Sicari,⁴ Francesco Stea,⁴ Fabrizio Bianchi¹ e Gruppo di lavoro SEpiAS*

¹ Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di epidemiologia ambientale e registri di patologia, Pisa

² Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di ricerca genetica, Pisa

³ Struttura complessa statistica ed epidemiologia, Registro tumori di Taranto, ASL Taranto

⁴ Istituto di fisiologia clinica del CNR, Unità di imaging cardiovascolare, polmonare e nuove tecnologie, Pisa

⁵ Istituto di genetica molecolare del CNR, Pavia

⁶ I.R.C.C.S. Fondazione S. Maugeri, Laboratorio misure ambientali e tossicologiche, Pavia

* vedi affiliazioni a pg 2 e ruolo di ciascun membro a pp. 28-29

Corrispondenza: Elisa Bustaffa; e-mail: elisa.bustaffa@ifc.cnr.it

Gruppo di lavoro SEpiAs: ruoli e responsabilità / SEpiAs Working group: roles and responsibilities.

Membri	Responsabilità scientifica di UO*	Definizione protocollo di studio	Attività di laboratorio	Elaborazione dati e analisi statistiche	Caratterizzazione ambiente e salute	Caratterizzazione cardiovascolare	Valutazione evidenze ed elaborazione rapporto scientifico	Attività supporto tecnico, gestionale, editoriale
Maria Grazia Andreassi	●	●	●				●	
Marino Artusa						●		
Angela Asaro			●					
Giorgio Assennato	●				●			
Fabrizio Bianchi**	●	●		●			●	●
Andrea Borghini			●					
Elisa Bustaffa				●	●		●	●
Simona Carone			●	●	●		●	●
Girolamo Catapano Minotti	●	●				●		
Achille Cernigliaro					●			
Francesco Cipriani	●				●			
Paolo Ciranni					●			
Alberto Ciuccarelli			●					
Alessio Coi				●			●	
Liliana Cori		●					●	●
Francesco Cuccaro					●			
Gabriella Dardanoni					●			
Daniela D'Ippoliti					●			●
Francesca Faita			●				●	
Francesco Faita						●	●	
Providenza Farruggia								●
Monica Ferri								●
Carmelo Ferrigno						●		
Ilenia Foffa			●					
Riccardo Frazzetta	●							●
Lorenzo Fugnoli			●					
Francesca Giurrandino			●					
Sabrina Grecchi			●				●	
Cristina Imiotti								●
Sonia Marrucci								●

* Unità operativa del Progetto CCM 2010 «Sorveglianza Epidemiologica in aree con inquinamento ambientale da Arsenico di origine naturale o antropica (SEpiAs)».

** Coordinatore del Progetto SEpiAs.

Gruppo di lavoro SEpiAs: ruoli e responsabilità / SEpiAs Working group: roles and responsibilities.

Membri	Responsabilità scientifica di UO*	Definizione protocollo di studio	Attività di laboratorio	Elaborazione dati e analisi statistiche	Caratterizzazione ambiente e salute	Caratterizzazione cardiovascolare	Valutazione evidenze ed elaborazione rapporto statistico	Attività supporto tecnico, gestionale, editoriale
Antonella Mercuri			●					
Francesco Messina			●					
Paola Michelozzi	●				●			
Salvatore Migliore	●				●			●
Gianfranco Miloro								●
Antonella Mincuzzi					●			●
Sante Aldo Minerba	●				●			●
Fabrizio Minichilli				●			●	
Claudio Minoia	●	●	●				●	
Mirella Mugnos								●
Daniela Nuvolone					●			●
Rosanna Panini								●
Claudia Prestipino			●					
Maria Angela Protti								●
Davide Ricci						●		
Luciano Romanini								●
Anna Ronchi			●				●	
Enrica Santelli								●
Salvatore Scondotto	●				●			
Maria Serinelli					●			
Ivana Scovassi	●		●				●	●
Rosa Sicari	●	●				●	●	
Luigi Sommariva						●		
Stefano Spagnolo					●			●
Domenico Spera	●							●
Loredana Stani								●
Francesco Stea						●	●	
Carmelo Tonelli						●		
Andrea Tortora						●		
Giordano Zampi						●		
Silvana Zolla			●					●

* Unità operativa del Progetto CCM 2010 «Sorveglianza Epidemiologica in aree con inquinamento ambientale da Arsenico di origine naturale o antropica (SEpiAs)».



Riassunto Summary

INTRODUZIONE

L'arsenico e i suoi composti inorganici sono classificati come cancerogeni certi per l'uomo. L'esposizione ad arsenico inorganico (As_i) nelle acque destinate al consumo umano è riconosciuta come associata a effetti cancerogeni e non cancerogeni. La valutazione del rischio di esposizione a livelli bassi o moderati di arsenico (As) rappresenta una sfida nell'ambito della ricerca e della salute pubblica.

Lo studio SEpiAs, finanziato dal CCM del Ministero della salute, è stato condotto in aree con inquinamento da arsenico di prevalente origine naturale, Amiata e Viterbese, o di origine industriale, Taranto e Gela.

MATERIALI E METODI

Sono stati campionati in modo casuale e stratificati per area, sesso e classi di età 271 soggetti (132 maschi) tra i 20 e i 44 anni. Con interviste mediante questionario sono state raccolte informazioni a livello individuale sulla storia residenziale, sullo stato socioeconomico, sull'esposizione ambientale e occupazionale, sullo stile di vita e sulle abitudini alimentari.

In campioni di urine dei soggetti reclutati sono state misurate le concentrazioni di As_i e delle forme metilate MMA e DMA, mediante l'utilizzo dello spettrometro di massa accoppiato induttivamente (DRC-ICP-MS), previa separazione cromatografica (HPLC).

Sono inoltre stati misurati numerosi biomarcatori molecolari, di danno al DNA e di rischio cardiovascolare.

La distribuzione di As_i e di As_i +MMA+DMA è stata descritta per ciascuna area e per i due sessi, mediante la media geometrica (MG), i percentili e la deviazione standard (DS). L'associazione tra livello di arsenico e variabili del questionario è stata valutata mediante regressione multipla.

RISULTATI

I risultati mostrano un'elevata variabilità dell'arsenico all'interno e tra aree. I campioni di Gela e Taranto hanno una concentrazione più elevata di As_i rispetto alla zona Amiatina e del Viterbese. I soggetti con $As_i > 1,5 \mu\text{g/l}$ o con As_i +MMA+DMA $> 15 \mu\text{g/l}$ (soglie di attenzione suggerite dalla Società italiana valori di riferimento-SIVR), sono rispettivamente 137 (50,6%) e 68 (25,1%).

Nel campione della zona Viterbese è emersa un'associazione positiva tra As_i e utilizzo di acqua potabile. I campioni di Gela e Taranto mostrano un'associazione positiva tra As_i ed esposizione occupazionale. Il consumo di pesce è associato con concentrazioni elevate di As_i per l'intero campione, in particolare tra i maschi di

INTRODUCTION

Arsenic and its inorganic compounds are classified as carcinogenic to humans. Exposures to inorganic arsenic (iAs) in drinking water are associated with both carcinogenic and non-carcinogenic effects. The risk assessment of exposures to low-moderate levels of environmental arsenic (As) is a challenging objective for research and public health.

The SEpiAs study, funded by the Italian Ministry of Health (CCM), was carried out in four areas with arsenic pollution prevalently of natural origin, Amiata and Viterbo areas, or of industrial origin, Taranto and Gela.

MATERIALS AND METHODS

271 subjects (132 men) aged 20-44, were randomly sampled stratifying by area, gender and age classes. Individual data on residential history, socio-economic status, environmental and occupational exposures, lifestyle and dietary habits, were collected through interviews using questionnaire.

In urine samples of recruited subjects, the concentration of inorganic arsenic (iAs) and methylated species (MMA, DMA) was measured using inductively coupled mass spectrometer (DRC-ICP-MS), after chromatographic separation (HPLC).

Molecular biomarkers and biomarkers of DNA damage, as well as markers of cardiovascular risk were measured

The distributions of iAs and iAs +MMA+DMA were described by area and gender, geometric mean (GM), percentiles and standard deviation (SD).

The associations between As species and variables collected by questionnaire were evaluated by multiple regression analysis.

RESULTS

Results showed a high variability of As species within and among areas.

Gela and Taranto samples showed higher iAs concentration compared to Viterbo and Amiata. Subjects with $iAs > 1,5 \mu\text{g/L}$ or iAs +MMA+DMA $> 15 \mu\text{g/L}$ (thresholds suggested by the Italian Society of Reference Values), are 137 (50,6%) and 68 (25,1%), respectively.

A positive association between iAs and use of drinking water emerged in the Viterbo sample, between iAs and occupational exposure in the Gela and Taranto samples.

Fish consumption was associated with higher iAs concentration in the whole sample, and particularly in men of the Gela sample. Similar results were observed for iAs +MMA+DMA.

Subjects with iAs or iAs +MMA+DMA values higher than the 95th percentile were 15 (6 Taranto, 5 Gela, 3 Viterbo, 1 Amiata).

Gela. Risultati simili si osservano considerando As_i +MMA+DMA. I soggetti con valori di As_i o As_i +MMA+DMA più elevati del 95° percentile sono risultati 15 (6 a Taranto, 5 a Gela, 3 nel Viterbese, 1 nell'Amiata).

I rapporti tra As_i e specie organiche (indici di efficienza di metilazione) risultano diversi per sesso e aree. È confermata l'importanza dei polimorfismi AS3MT Met287Thr, GST-T1, GST-M1, OGG1.

L'analisi dello spessore medio-intimale carotideo ha evidenziato valori nella norma, ma più elevati tra gli uomini del Viterbese, Taranto e Gela.

CONCLUSIONI

I risultati sono informativi di esposizioni a As inorganico e organico in quote ampie, o comunque non trascurabili, dei campioni studiati.

I risultati nel loro complesso suggeriscono di approfondire ulteriormente lo studio delle vie di esposizione a specie organiche e inorganiche di arsenico, e supportano la raccomandazione di attuare misure di prevenzione primaria finalizzate a ridurre il livello di esposizione delle popolazioni.

The relationships between iAs and organic species (methylation efficiency ratios) were different between sex in the four areas.

The relevance of polymorphisms AS3MT Met287Thr, GST-T1, GST-M1, OGG1 was confirmed.

The analysis of carotid intima-media-thickness showed normal values, but higher among men of Viterbo, Taranto and Gela areas.

CONCLUSIONS

Results are informative of exposure to inorganic and organic As in large or at least non-negligible quotas of the samples.

The SEpiAs results suggest a further deepening on routes of exposure to arsenic species, and support the recommendation to implement primary prevention measures to reduce population exposure.

Parole chiave: arsenico, inquinamento dell'ambiente, biomonitoraggio umano, biomarcatori di effetto precoce, rischio cardiovascolare, danno al DNA

Keywords: arsenic, environmental pollution, human biomonitoring, biomarkers of early effect, cardiovascular risk, DNA damage

Introduzione Introduction

IL TEMA SCIENTIFICO DELL'ESPOSIZIONE DELLA POPOLAZIONE AD ARSENICO

Più di 30 anni fa, sulla base di evidenze ritenute sufficienti per i tumori della pelle e del polmone, l'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) ha valutato l'arsenico (As) e i composti arsenicali come cancerogeni per l'uomo.¹ L'arsenico in acqua per uso umano è stato classificato come cancerogeno accertato per l'uomo (Gruppo 1) sulla base di studi epidemiologici e sperimentali di carcinogenesi ritenuti adeguati allo scopo.^{2,3 (2,3?)}

Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse intorno alle esposizioni a dosi moderate di arsenico inorganico (As_i) e di forme organiche e alle loro conseguenze sulla salute in riferimento a diverse patologie non tumorali per le quali le evidenze sono ancora insufficienti o limitate, come le malattie cardiovascolari, il diabete e i disordini neurologici.

Oltre alla perdurante attenzione rivolta alle comunità esposte a livelli elevati di As nelle acque, sono di crescente interesse i possibili effetti sulla salute di esposizioni a livelli moderati, che interessano popolazioni più ampie. La valutazione dei rischi sanitari associati all'esposizione a concentrazioni di As in acqua superiori al livello di protezione per la salute di 10 µg/l³ e inferiori a 50 o 100 µg/l è oggetto di considerevole interesse nei campi della sanità pubblica, della ricerca e della legislazione.

Un interesse crescente inoltre riguarda altre vie di esposizione, con particolare riferimento alla catena alimentare e alla via inalatoria. Gli studi epidemiologici su popolazioni esposte a concentrazioni moderate di As nelle acque potabili sono comunque ancora limitati ed eterogenei.

In Italia il problema della presenza di As nelle acque per usi civili ha riguardato vaste aree, suscitando inquietudine nelle comunità coinvolte. Negli anni recenti in numerosi Comuni sono stati effettuati interventi per garantire l'adeguamento al livello di concentrazione di 10 µg/l, in alcuni casi ancora in corso di realizzazione. Infatti, dopo le deroghe concesse dalla Commissione europea all'Italia tra il 2003 e il 2010 rispetto al valore di 10 µg/l stabilito dal DLgs 31/2001 (attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano), il 28 ottobre 2010 la C.E. concedeva un'ultima deroga a 20 µg/l, scaduta il 31 dicembre 2012.

GLI OBIETTIVI DI SEPIAS

L'obiettivo generale di SEPIAs (Sorveglianza epidemiologica in aree interessate da inquinamento ambientale da arsenico di origine naturale o antropica) è valutare la relazione tra esposizione umana ad arsenico, stimata attraverso dati di inquinamento

ambientale e valutata mediante indicatori di dose assorbita, e marcatori biologici di effetto precoce sulla salute, allo scopo di definire indicatori per un sistema avanzato di sorveglianza ambiente-salute. In particolare, gli obiettivi specifici sono:

- caratterizzazione ambientale e sanitaria nelle zone di interesse, mirata alla definizione di *proxy* di esposizione;
- misura dell'esposizione individuale attraverso biomonitoraggio umano delle concentrazioni di As nel sangue e nelle urine in campioni casualizzati di popolazione residente in quattro aree di interesse;
- misura di biomarcatori di effetto precoce e di rischio preclinico: marcatori cromosomici/molecolari di suscettibilità e danno genetico ed epigenetico, marcatori molecolari di danno al DNA, stress, apoptosi, marcatori di rischio cardiovascolare;
- valutazione delle associazioni tra misure di esposizione e di effetto biologico attraverso: analisi statistica dei dati analitici e clinici, analisi di correlazione tra dati su ambiente e salute, dati reperiti dal questionario e dati dei marcatori;
- definizione di indicatori per un sistema avanzato di sorveglianza ambiente-salute.

IL PROGETTO SEPIAS

Si è ritenuto interessante svolgere questo studio in aree caratterizzate da contaminazione da arsenico di origine prevalentemente naturale e in aree caratterizzate da contaminazione da arsenico di origine antropica. Con questo proposito sono state identificate per lo studio SEPIAs le aree del monte Amiata e del Verbano, quest'ultima sostituita successivamente con quella del Viterbese per motivi di criticità organizzativo-gestionali: queste aree sono caratterizzate da contaminazione dei terreni e delle acque. Le aree di Taranto e Gela sono invece caratterizzate dalla presenza di impianti industriali, per alcuni dei quali sono riportati dati di emissione di arsenico nelle acque e nell'aria (European Pollutant Release and Transfer Register – EPER, <http://prtr.ec.europa.eu/>). L'area di Gela era già stata coinvolta nel periodo 2008-2009 nello studio di biomonitoraggio umano Sebiomag.⁴

Sono stati selezionati quindi i Comuni di Civita Castellana e Ronciglione (Viterbo), il Comune di Abbadia San Salvatore (Amiata), il Comune di Taranto, i Comuni di Gela, Niscemi e Butera. In ciascuna delle aree sono state coinvolte le istituzioni sanitarie e le strutture in grado di fornire i dati di caratterizzazione ambientale delle regioni interessate rilevanti per questo lavoro.

Il disegno dell'indagine è epidemiologico osservazionale campionario, multicentrico, basato sulla misura di marcatori bio-

logici e di rischio preclinico. Per ciascun soggetto reclutato (età 20-44 anni) sono stati previsti:

- un'intervista tramite questionario standardizzato su dati antropometrici, storia residenziale, condizioni socioeconomiche, esposizioni ambientali e occupazionali, stile di vita, dieta;
- un prelievo di sangue;
- il prelievo di un campione di urine;

■ la misura non invasiva di parametri clinici cardiovascolari. Nella prima parte del 2012 è stata realizzata una serie di prove preliminari di laboratorio. Nella seconda parte del 2012 sono stati realizzati interviste, prelievi e indagini cardiologiche nelle quattro aree, con spedizioni dei campioni via corriere ai centri competenti responsabili delle analisi e della valutazione dei risultati.

Capitolo 1

Le conoscenze e le ipotesi Knowledge and hypothesis

CARATTERISTICHE E TOSSICITÀ DELL'ARSENICO

L'arsenico è un semimetallo, o metalloide, posizionato nella tavola periodica degli elementi a metà tra le proprietà dei metalli e quelle dei non-metalli.

In natura si trova solitamente in piccole quantità nelle rocce, nei suoli, nelle polveri e nell'aria. È utilizzato in molti prodotti e processi industriali e viene immesso nell'ambiente (aria, acqua e suolo) tramite rifiuti ed emissioni, spesso divenendo un contaminante significativo.

L'As elementare si presenta nelle tre forme allotropiche gialla, nera e grigia, è stabile a temperatura ambiente e sublima a 630°C. Si combina rapidamente con cloro e fluoro a caldo e con molti metalli e non-metalli. È un elemento molto reattivo, non è solubile in acqua, mentre i suoi sali sono più o meno solubili in funzione del pH e dell'ambiente ionico.

Esiste in quattro stati di ossidazione (-3, 0, +3, +5). In condizioni riducenti, lo stato di valenza +3, come arsenito, o As(III), è la forma dominante, mentre la valenza +5, come arseniato, o As(V), è la forma più stabile in condizioni ossidanti.⁵ As(III) e As(V) sono le specie prevalenti nelle acque naturali, nelle quali possono anche essere presenti, in concentrazione inferiore, l'acido monometilarsenico (MMA), l'acido dimetilarsinico (DMA) e le specie arsenicali monometilate [MMA(III)] e dimetilate trivalenti [DMA(III)]. Ulteriori specie arsenicali rilevate in acqua di mare e in acqua dolce potrebbero rappresentare fino al 20% di As totale.²

La natura chimica dei composti dell'arsenico, e in particolare la loro tendenza a mutare rapidamente stato di valenza e forma chimica in un ampio spettro di valori di pH e di condizioni redox, rende difficile valutarne destino e mobilità nell'ambiente.⁶ Tutte le fonti di As rischiano di contaminare vaste aree e suoli destinati all'agricoltura. La sua presenza nei suoli e nei corsi d'acqua fa in modo che tale elemento si trovi nei tessuti di diverse specie vegetali; perciò, in seguito al trasferimento dal suolo alla pianta, la dieta risulta una delle principali vie di esposizione dell'uomo al metalloide.⁵

L'aspetto più rilevante nei processi biologici è che, come molti altri metalli essenziali (ferro, zinco, rame), l'arsenico è in grado di mimare l'azione del fosforo sostituendosi a esso in alcune reazioni biochimiche.

Tutte le forme di As sono tossiche, ma sono la mobilità, la forma chimica e la capacità d'interagire con i composti endogeni dell'organismo umano a determinare il grado di tossicità delle varie specie. Le forme organiche sono potenzialmente meno dannose di quelle inorganiche perché vengono in genere prontamente eliminate dall'organismo, tuttavia le forme che hanno subito un processo di metilazione sono più tossiche delle forme dimetilate.

L'As(III) è 25-60 volte più tossico dell'As(V) e centinaia di

volte più tossico della forma elementare e di quelle organiche. L'assunzione giornaliera di arsenico totale derivante da cibo e bevande è compresa tra 0,13 e 0,56 µg/kg peso corporeo (p.c.) al giorno.⁷ Con un tasso di respirazione di 20 m³/giorno, l'inhalazione di As è stimata in 0,02-0,2 µg/giorno in aree rurali, 0,4-0,6 µg/giorno in città senza emissioni industriali, 1 µg/giorno in aree poco inquinate, fino a 10 µg/giorno in aree industrializzate.⁵

Nel 2009 il comitato congiunto di esperti FAO-WHO (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA) aveva stabilito che una quantità di arsenico di 15 µg/kg (p.c.) a settimana rappresentasse la massima assunzione tollerabile per un essere umano (*provisional tolerable weekly intake*, PTWI).⁷ Tale limite è stato poi ritirato in quanto diversi effetti, sia cancerogeni sia non cancerogeni, sono stati descritti in associazione a valori più bassi di questo cut-off.⁷ Il comitato è riuscito a ricavare una *benchmark dose* di 0,5 – ossia una dose associata a un incremento del rischio di tumore dello 0,5%, prossima al livello tollerabile precedentemente indicato.⁷

L'Environmental Protection Agency (EPA) considera l'As un inquinante prioritario a causa della sua tossicità verso un ampio spettro di organismi anche a livello di tracce e stabilisce il limite massimo della presenza di questo elemento (*maximum contaminant level* – MCL) nelle acque potabili a 0,010 ppm.⁸ L'Unione europea ha fissato tale livello protettivo a 10 µg/l.⁹

Nel 2010 la Commissione scientifica sui rischi per la salute e per l'ambiente (Scientific Committee on Health and Environmental Risks – SCHER), analizzando le deroghe della direttiva 98/83/CE sulle acque destinate al consumo umano e basandosi su una metanalisi di dati epidemiologici, ha affermato che il rischio di tumore diminuisce rapidamente in modo più che proporzionale al calare della dose/concentrazione di arsenico.¹⁰

La tossicità delle forme organiche trivalenti MMA(III) e DMA(III) è riconosciuta da tempo in individui esposti ad arsenico inorganico.¹¹ La metilazione dell'arsenico inorganico non costituisce infatti un meccanismo di detossificazione bensì di bioattivazione, che ne aumenta la tossicità.^{12,13}

L'As è una sostanza tiolopriiva, che ha un particolare tropismo per i gruppi sulfidrilici (-SH) di proteine importanti per la funzionalità degli enzimi che agiscono da protettori cellulari, come il glutathione (GSH). L'arsenico causa quindi la riduzione dei sistemi difensivi della cellula, alterando la struttura quaternaria delle proteine e interferendo con un ampio spettro di vie coinvolte nella crescita, proliferazione, apoptosi e sopravvivenza cellulare. Spesso tale affinità con i gruppi sulfidrilici causa la formazione di radicali liberi come l'ossido nitrico (NO) e l'anione superossido (O₂⁻).¹³⁻¹⁵

Nell'uomo l'As può causare una serie di patologie: lesioni cutanee

(iperpigmentazione, melanosi, cheratosi), problemi all'apparato respiratorio (tosse cronica, respiro corto, bronchite), effetti sul sistema nervoso (neuropatie, disordini neurocomportamentali, perdita di memoria, basso quoziente intellettivo, disturbo della attenzione), cancro in numerosi organi (pelle, polmone, vescica) ed effetti sul sistema riproduttivo (complicazioni durante la gravidanza, anomalie fetali, parto prematuro, basso peso alla nascita), oltre a patologie cardiovascolari e diabete.

La comprensione a livello molecolare dei meccanismi attraverso i quali l'esposizione all'As determina le patologie sopra citate è ancora frammentaria. In questo contesto è di crescente interesse lo studio di marcatori di effetto biologico e di danno precoce, alcuni dei quali considerati nell'ambito di questo progetto, e sono promettenti alcuni microRNA importanti per la regolazione di una serie di processi biologici fondamentali per la cellula, come la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi.

L'arsenico inorganico può essere assorbito sia attraverso il tratto gastrointestinale sia attraverso le vie cutanea e inalatoria.⁵ L'arsenico, nelle sue specie inorganiche e in quelle organiche, successivamente all'ingestione è rapidamente assorbito nel tratto gastrointestinale. La sua biodisponibilità dipende da vari fattori che sono stati valutati attraverso studi *in vivo* e che comprendono la solubilizzazione nei fluidi gastrointestinali, l'assorbimento attraverso l'epitelio gastrointestinale ma anche la forma chimica in cui si trova l'elemento.¹⁶ L'arsenico assorbito entra nel circolo sanguigno, dove si lega a varie proteine plasmatiche e viene trasportato nei vari distretti nell'organismo arrivando infine nelle cellule dove è assorbito attraverso le acquaporine o le esospermeasi.¹⁷

La sua metabolizzazione avviene a livello epatico attraverso una serie di reazioni di riduzione e metilazione che sono finalizzate all'escrezione attraverso le urine. Il metabolismo dell'arsenico consta di due reazioni sequenziali:

■ la riduzione della forma pentavalente As(V) e la formazione di composti quali l'acido monometilarsonico (MMA) e l'acido dimetilarsonico (DMA);

■ la metilazione ossidativa dell'As(III), l'acido monometilarsonoso [MMA(III)] e l'acido dimetilarsonoso [DMA(III)].

L'uomo elimina più MMA rispetto ad altre specie, il che suggerisce una maggiore lentezza di metilazione e una maggiore sensibilità.¹⁸ Nell'urina il DMA è contenuto in misura maggiore rispetto ad As_i e MMA, ma con una elevata variabilità tra individui dipendente dal metabolismo e dalla suscettibilità genetica. A livello intraindividuale il metabolismo risulta piuttosto stabile, suggerendo il ruolo di polimorfismi genetici nella regolazione degli enzimi che metabolizzano l'As, con conseguenze importanti in termini di tossicità.¹⁹⁻²¹ Le componenti genetica ed epigenetica sono trattate più diffusamente di seguito.

Oltre alle varianti genetiche, anche fattori etnici, demografici, alimentari (es: assunzione di folati e selenio) influenzano le capacità individuali di metilazione e quindi la variabilità interindividuale.²² Le differenze in tossicità e metabolismo delle varie specie inducono a ritenere necessario distinguere il contributo di As(III), As(V), delle forme metilate e di altri composti come tetraalchilarsonati (es: arsenobetaina), ossidi di trialchilarsona (es: ossidi di arsenozuccheri) e i meno conosciuti tioarsenicali e arsenolipidi. I metodi spettroscopici tradizionali non sono in grado di effettuare un'ana-

lisi di speciazione e sono utilizzati per la determinazione dell'arsenico totale. La speciazione dell'As richiede un accoppiamento con tecniche separative, quali la cromatografia in fase liquida a elevate prestazioni (HPLC).

La speciazione dell'As è un argomento che si sta studiando da tempo, ma solo ultimamente ha subito un incremento notevole grazie sia allo sviluppo delle tecniche analitiche sia al miglioramento della comprensione tossicologica a essa correlata. Sono stati identificati tre gruppi di composti: composti tetraalchilarsonati (es: arsenobetaina), ossidi di trialchilarsona (es: ossidi di arsenozuccheri) e i meno conosciuti tioarsenicali e arsenolipidi.^{23,24}

Gli avanzamenti conoscitivi sul trasporto e il comportamento delle diverse specie dell'As nei diversi distretti corporei hanno permesso di migliorare le tecniche di indagine sulle matrici. In particolare, le indagini analitiche sulle unghie sono considerate con crescente interesse, specie per lo studio dell'associazione tra esposizione ad As inorganico, metilazione del DNA, dieta e livello di folati.^{25,26}

La maggior parte degli studi di speciazione dell'As riguarda la matrice urina sia per la facilità e semplicità nella raccolta, sia perché l'As urinario è un biomarcatore che permette la valutazione del metabolismo; infatti l'As e i suoi metaboliti sono rapidamente assorbiti a livello intestinale ed escreti attraverso le urine. Il 45-85% dell'As viene escreto nell'urina in 1-3 giorni dall'esposizione e la matrice urina, sebbene marcatore di esposizione precoce, è utilizzata sia per monitorare soggetti professionalmente esposti, sia per studi di popolazione generale, soprattutto in esposizioni continue e influenzate da fattori antropici locali. Maggiori dettagli sono riportati nell'Allegato 14.

GENOTOSSICITÀ DELL'ARSENICO

E' noto da tempo che l'arsenico inorganico ha un forte effetto genotossico nelle cellule causando modificazioni al DNA come aneuploidie, formazione di micronuclei, aberrazioni cromosomiche, delezioni, scambio di cromatidi fratelli e legami crociati tra DNA e proteine.²⁷ Sono stati proposti diversi meccanismi per spiegare la genotossicità dell'arsenico, tra i quali l'induzione di stress ossidativo e l'inibizione dei meccanismi di riparazione del DNA.²⁸

E' stato dimostrato che l'arsenico non reagisce in modo diretto con la molecola del DNA: non è infatti in grado di causare mutazioni puntiformi come altre sostanze mutagene. Tuttavia, a dispetto della sua scarsa capacità di causare mutazioni, esso agisce sull'attività mutagena di altre sostanze cancerogene. Per esempio, è stato osservato un aumento sinergico della mutagenicità in cellule umane e di mammifero trattate con UV ed esposte ad arsenico.²⁹ Una serie di osservazioni sperimentali suggerisce inoltre che la genotossicità dell'arsenico è principalmente collegata al rilascio di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) che avviene durante la sua biotrasformazione nell'organismo.³⁰ I ROS sono in grado infatti di generare addotti del DNA, rotture della doppia elica, legami crociati e aberrazioni cromosomiche. Inoltre, uno dei principali effetti del danno da stress ossidativo è l'ossidazione delle basi azotate del DNA. In particolare, la modificazione più frequente è l'ossidazione della guanina con formazione di 8-oxoguanina, spesso utilizzata come marker di stress ossidativo in studi epidemiologici. La formazione di 8-oxoguanina in seguito a esposizione ad As_i è stata documentata in diversi tessuti.³¹ Recentemente i livelli urinari di 8-

oxoguanina sono stati correlati ai livelli di arsenico inorganico in popolazioni con esposizione a bassi livelli di arsenico.³² Un altro effetto dell'arsenico, anche a basse concentrazioni, sulla molecola del DNA è l'induzione di rotture. Infatti, rotture a singola elica del DNA sono causate sia dall'effetto dei ROS sia indirettamente durante il corso dei meccanismi di riparazione della molecola.

L'arsenico è un noto induttore di aberrazioni cromosomiche e cromatidiche e causa effetti di tipo clastogenico e aneuploidogeno nelle cellule. Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi basati su metodiche di citogenetica (test di scambio dei cromatidi fratelli, *sister chromatid exchange* – SCE), test del micronucleo (MN), test di aberrazioni cromosomiche (AC), al fine di valutare gli effetti genotossici in popolazioni esposte. Questi studi hanno osservato un aumento di incidenza di AC in individui esposti cronicamente all'arsenico.³³⁻³⁵ Inoltre è stato osservato un aumento della frequenza dei MN in linfociti da sangue periferico, in cellule boccali e in cellule uroteliali negli individui esposti rispetto alla popolazione di controllo.^{36,37} Tutti insieme questi lavori mostrano come i biomarcatori cromosomici, in particolare AC e MN, siano marcatori molto sensibili di effetti biologici precoci dovuti all'esposizione ad arsenico. Solo pochi studi, infatti, non hanno osservato un effetto citogenetico in soggetti esposti, probabilmente a causa dello scarso numero di individui analizzati.³⁸ In dettaglio, i risultati hanno mostrato che non vi è alcuna differenza significativa nelle frequenze di SCE spontanea e mitomicina C-indotta tra i casi di cancro e il gruppo di controllo.³⁸ Infine, l'inibizione dei sistemi di riparazione del DNA è considerato uno dei principali meccanismi di genotossicità dell'arsenico. Il sistema di riparazione per escissione nucleotidica (*nucleotide excision repair* – NER) e il sistema di riparazione per escissione di basi (*base excision repair* – BER) sono i processi implicati nella riparazione del danno da stress ossidativo dopo esposizione all'arsenico. In particolare, il sistema NER è il principale *pathway* implicato per la riparazione delle distorsioni della doppia elica del DNA, mentre il sistema BER è implicato nella riparazione della rottura a singolo filamento della molecola indotta dai ROS. E' stato dimostrato come l'esposizione all'arsenico sia in grado di reprimere l'espressione di geni implicati in questi sistemi con una conseguente riduzione della capacità della cellula di riparare il DNA.³⁹⁻⁴³

Si ipotizza che tutti questi meccanismi di genotossicità nelle cellule possano contribuire all'azione cancerogena dell'arsenico all'interno dell'organismo. Tuttavia, il meccanismo alla base della cancerogenicità non è ancora ben chiaro e l'estrapolazione lineare dalle alte alle basse dosi, sulla quale si basano i dati più allarmanti sugli effetti clinici dell'arsenico, potrebbe comportare una significativa sovrastima dei possibili rischi. In accordo a ciò, la Commissione SCHER nel suo documento del 2010 afferma che, in base alle evidenze tossicologiche ed epidemiologiche disponibili, il rischio aggiuntivo per le popolazioni esposte concentrazioni di arsenico nelle acque potabili fino a 50 µg/l è generalmente tollerabile, indipendentemente dalla fascia di età.¹⁰

Nell'ambito del progetto SEPIAs si è scelto di valutare la presenza di specifici polimorfismi funzionali di geni coinvolti nei meccanismi di detossificazione metabolica e di riparazione del DNA al fine di definire diverse capacità metaboliche e riparative connesse alla costituzione genetica (presenza di polimorfismi genetici) che pos-

sono creare le basi per differenze interindividuali nell'induzione degli effetti biologici e clinici derivanti da fattori di esposizione ambientale.⁴⁴⁻⁴⁶ In particolare:

■ **AS3MT (Met287Thr)**: l'enzima AS3MT è implicato nel processo di metilazione ossidativa dell'arsenico nell'organismo. Il polimorfismo Met287Thr nel gene AS3MT è associato a una maggiore attività enzimatica con conseguenti variazioni nel metabolismo dell'As. In particolare, i portatori dell'allele mutato AS3MT287Thr presentano una variazione del profilo standard di escrezione dei metaboliti urinari dell'arsenico con una maggiore presenza di metaboliti metilati (in particolare MMA);

■ **GSTT1-GSTM1 (+/-)**: gli enzimi della glutatione transferasi (GST) GSTT1 e GSTM1 sono implicati nei processi di detossificazione dell'organismo dagli xenobiotici. Gli individui portatori del polimorfismo nullo dei geni GST hanno una minore capacità di detossificazione rispetto agli individui *wildtype*. Dati presenti in letteratura indicano che in popolazioni esposte all'arsenico gli individui mutati presentano maggiori concentrazioni di As_i e dei suoi metaboliti nelle urine;

■ **p16, p21 e p53**: proteine che presiedono al controllo del ciclo cellulare. Dati presenti in letteratura mostrano come l'esposizione cronica all'As sia correlata ad alterazioni nella metilazione del DNA (ipermetilazione promotore-specifica) con una conseguente riduzione dei livelli di espressione genica;

■ **hOGG1 (Ser326Cys)**: l'enzima hOGG1 è implicato nel meccanismo di riparazione del danno ossidativo sul DNA. Il polimorfismo Ser326Cys nel gene hOGG1 è associato a una minore attività enzimatica e a una minore capacità di riparazione del danno al DNA;

■ **XRCC1 (Arg399Gln)**: il gene XRCC1 codifica per una proteina deputata alla riparazione (*BER*) di danni al DNA. Il polimorfismo Arg399Gln nel gene XRCC1 è associato a una minore attività enzimatica e a una minore capacità di riparazione. Si osserva che individui portatori del genotipo mutato XRCC1399Gln presentano un aumento delle rotture della doppia elica del DNA.

MARCATORI DI DANNO AL DNA, DI STRESS CELLULARE E DI APOPTOSI

Numerosi agenti chimici e fisici causano danni al DNA. Tra questi danni, le rotture indotte nella molecola che porta l'informazione genetica sono particolarmente pericolose per il corretto funzionamento delle cellule, ed è quindi importante determinare la potenzialità di provarli da parte di inquinanti ambientali, tra cui l'arsenico. Poiché la modificazione di una proteina legata al DNA, l'istone H2AX, è una delle risposte più precoci che la cellula mette in atto per contrastare le rotture al DNA, determinare i livelli di questa proteina modificata è un mezzo per stimare la presenza di rotture nel DNA. L'analisi della proteina H2AX modificata può essere effettuata analizzandone i livelli dopo esperimenti di immunofluorescenza indiretta condotti con un anticorpo che riconosce specificamente la forma fosforilata.⁴⁷

In condizioni di stress cellulare, come esposizione a sostanze mutagene, danno al DNA, cambiamenti dell'ambiente intracellulare, una delle prime risposte della cellula è l'attivazione della proteina PARP-1, un sensore di situazioni di potenziale pericolo per la cellula. La proteina reagisce al pericolo con la sintesi del polimero

PAR, che promuove i meccanismi di difesa della cellula e può essere visualizzato all'interno della cellula dopo esperimenti di immunofluorescenza indiretta basati sull'uso di un anticorpo monoclonale diretto contro di esso.^{48,49}

Le cellule apoptotiche hanno caratteristiche che le rendono riconoscibili al microscopio; dal punto di vista molecolare, presentano una cascata di reazioni che culminano con l'attivazione di una proteasi, la caspasi 3. Utilizzando un anticorpo in grado di rivelare la forma attiva di questo enzima è possibile monitorare l'apoptosi.⁴⁵⁻⁵³

ESAMI CARDIOVASCOLARI

La contaminazione da arsenico nelle falde acquifere è un problema di salute pubblica in varie parti del mondo, prevalentemente nei Paesi in via di sviluppo. Vari studi di popolazione hanno messo in relazione l'esposizione ad alti livelli di arsenico, in particolare nell'acqua potabile, con l'aumento di incidenza di malattia coronarica, arteriopatia periferica e mortalità cardiovascolare.⁵⁴ Si è inoltre evidenziata un'associazione sia tra l'esposizione ad arsenico e fattori di rischio cardiovascolare quali l'ipertensione arteriosa, il diabete mellito e il danno renale, sia tra esposizione ad arsenico e danno vascolare subclinico, come l'aterosclerosi carotidea.¹⁵ I meccanismi coinvolti nel fenomeno sono ancora da chiarire, ma il primo passo pare essere rappresentato dalla disfunzione endoteliale.⁵⁵

Meno chiari sono gli effetti dell'esposizione a bassi livelli di arsenico e il loro impatto sull'apparato cardiovascolare: a tali livelli, l'effetto atteso è minore, e le limitazioni di metodo (come la difficoltà

di stabilire con precisione l'esposizione cumulativa, ma anche di distinguere arsenico organico e inorganico) hanno un maggior peso, così come le difficoltà di stabilire outcome affidabili e il ruolo dei fattori di confondimento.

I segni precoci di modificazione funzionale o strutturale (indici ultrasonografici di spessore medio-intimale carotideo, funzione endoteliale e *compliance* arteriosa e/o i livelli circolanti delle cellule progenitrici endoteliali circolanti) sono predittori di eventi clinici a carico del sistema cardiovascolare, utili inoltre per valutare la suscettibilità individuale.

Nell'ambito del progetto SEpiAs gli indicatori precoci selezionati sono stati:

■ **ispessimento medio-intimale carotideo (IMT)** - L'ispessimento medio-intimale dell'arteria carotide è un noto fattore di rischio per lo sviluppo di eventi cardiovascolari.^{56,57} Data l'associazione fra esposizione ad arsenico e aumento di eventi cardiovascolari, e quella fra arsenico e altre alterazioni subcliniche che si situano nel continuum cardiovascolare, quali l'ipertensione arteriosa e l'aterosclerosi, è stata indagata l'associazione fra spessore medio-intimale e livelli di arsenico.

■ **calcium score (CS) coronarico ecografico** - Placche calcificate all'interno delle coronarie costituiscono un marker di carico aterosclerotico predittivo di futuro rischio di eventi cardiovascolari. Solitamente esso viene valutato tramite analisi di immagini CT (*Agatston score*). Il CS ecografico utilizzato è un'alternativa di pari livello diagnostico, ma ottenuto con una metodologia di *imaging* semplice, molto diffusa, poco costosa e non ionizzante.⁵⁸

Capitolo 2

Materiali e metodi

Materials and methods

IL CAMPIONE DI SEPIAS

Nella **tabella 1** è riportata la distribuzione per area dei soggetti reclutati secondo gli obiettivi prefissati, la rispondenza al contatto, l'adesione all'intervista, nella **tabella 2** le numerosità campionarie dei dati raccolti, stratificati per area, sesso e classi di età. Si deve comunque tenere conto che:

- la maggior parte dei soggetti che non è stato possibile contattare tra i selezionati erano domiciliati temporaneamente fuori sede e il 17,6% di casi non trovati nel complesso delle quattro aree non differisce significativamente dalla percentuale delle singole aree; il valore più elevato riscontrato a Taranto (26,0%) rispetto al valore minimo nell'Amiata (12,9%) può essere ragionevolmente motivato dalle differenti caratteristiche e complessità dei luoghi;
- il numero di contattati che non si sono presentati all'intervista e poi al prelievo, prevalentemente per difficoltà logistiche, è stato abbastanza contenuto e omogeneo tra aree;
- il numero finale dei partecipanti alla campagna di prelievo è numericamente in linea, o molto vicino, all'obiettivo prefissato, tenendo conto di situazioni locali, e molto superiore a quello definito nel Protocollo approvato e finanziato dal CCM;
- la ripartizione per sesso ed età stabilita dal Protocollo è stata so-

stanzialmente garantita, seppure occorra menzionare gli sbilanciamenti di Gela, con più maschi nella classe 40-44 anni a sfavore della classe 20-29 e più femmine nella classe 20-29 a scapito della classe 30-39 (**tabella 2**).

In conclusione, considerando quanto sopra e senza poter escludere che vi siano stati meccanismi di selezione nel corso del complesso iter di selezione-contatto-intervista-prelievo, il campione analizzato non mostra rilevanti differenze rispetto a quello selezionato.

COMPITI E STRUTTURA DI SEPIAS

Nella **tabella 3** sono dettagliate le UO SEpiAs e le responsabilità stabilite.

MATERIALI DI SEPIAS

Tutti i materiali distribuiti durante il progetto vengono allegati in formato elettronico.

Il «Protocollo di studio» (Allegato 1) è stato inviato e approvato dai quattro comitati etici di ciascuna delle ASL coinvolte nel progetto. Nelle aree di interesse il reperimento dei volontari ha seguito diverse procedure, che dipendevano da aspetti organizzativi e dal contesto. In ogni caso sono stati avvertiti e coinvolti i medici curanti

Area	Obiettivo 1	Obiettivo 2	Selezionati	Contattati >B		Partecipanti (E)		Rispondenti a prelievo (F)		% su obiettivo 2 (B)
	A	B	C	n	%	n	%	n	%	
Amiata (a)	50	70	100	79	112,9	73	92,4	58	84,1	82,9
Viterbese (b)	50	70	100	83	118,6	72	86,7	72	97,3	102,9
Taranto (c)	50	50	100	63	126,0	52	82,5	50	96,2	100,0
Gela (d)	50	100	200	116	116,0	93	80,2	91	95,8	91,0
totale	200	290	500	341	117,6	290	85,0	271	93,4	93,4

A) obiettivo minimo previsto dal protocollo SEpiAs;

B) obiettivo concordato nel corso dello studio per tenere conto di esigenze locali: a Gela l'obiettivo è stato raddoppiato a causa della forte pressione locale per effetto del precedente studio di BMU "SEBIOMAG",⁴ sull'Amiata e nel Viterbese l'obiettivo iniziale è stato incrementato per rispondere alle richieste emerse a livello locale;

C) soggetti selezionati per sesso e per classi di età secondo i seguenti criteri:

(a) lista di soggetti residenti da elenco assistiti, fonte: ASL 7 Senese;

(b) lista assistiti, fonte: ASL (VT);

(c) lista soggetti residenti a Taranto e a Statte da lista ASL;

(d) lista di 40 soggetti tra i 184 partecipanti al precedente studio Sebiomag⁴ (>20% estratti casualmente) + 160 da anagrafe assistiti, fonte: ASP (CL).

D) soggetti contattati per il raggiungimento dell'obiettivo 2 (B) e percentuale oltre l'obiettivo: l'eccesso rispetto a 100 rappresenta la percentuale dei non disponibili o dei rifiuti; per esempio a Taranto, per ottenere l'obiettivo prefissato di 50 sono stati contattati 63 soggetti (126%).

Si noti che a Gela hanno aderito 33 dei 40 soggetti (82,5%) dei selezionati dal precedente studio Sebiomag; i soggetti fonte ASP (CL) contattati per raggiungere i 100 prefissati sono stati quindi 76;

E) soggetti partecipanti allo studio;

F) soggetti che hanno aderito al prelievo di sangue e donato urine.

A) minimum target according to SEpiAs protocol;

B) target agreed in the course of the study to take account of local needs: in Gela the goal was doubled due to the strong local pressure as a result of previous study of human biomonitoring "SEBIOMAG",⁴ in Amiata and Viterbo the original goal was increased in response to requests made at local level;

C) subjects selected, by sex and age classes, according to the following criteria:

(a) list of residents by the assisted list, list of citizens assisted by public healthcare services (source: ASL 7 of Siena);

(b) assisted list, list of citizens assisted by public healthcare services (source: ASL of Viterbo);

(c) list of residents in Taranto and Statte by the public healthcare services (ASL) list;

(d) list of 40 subjects among the 184 participants of the previous study Sebiomag⁴ (>20% randomly chosen) + 160 from the list of citizens assisted by public healthcare services (source: ASP of Caltanissetta).

D) subjects contacted to achieve Goal 2 (B) and percentage above the goal: the excess respect to 100 represents the percentage of unavailable subjects or refusals; for instance, in order to obtain the target of 50 (126%), in Taranto 63 subjects were contacted. Note that in Gela participated 33 of the 40 (82.5%) subjects selected in the previous Sebiomag study; in order to obtain the target of 100, 76 subjects were therefore selected from the list of citizens assisted by public healthcare services of Caltanissetta (ASP, CL);

E) subjects participating in the study;

F) subjects participating in the study, providing blood and urine samples.

Tabella 1. Distribuzione per area dei soggetti reclutati secondo gli obiettivi prefissati, la rispondenza al contatto, l'adesione all'intervista e al prelievo.

Table 1. Distribution by area of subjects recruited according to predetermined goals, their responsiveness to the contact, the adherence to the interview and the sampling.

Area	Sesso	Età	Totale	Questionario	Genetica	As	IMT*	Apoptosi
Amiata	M	20-29	13	12	11	10	6	11
		30-39	16	15	12	12	10	12
		40-44	6	6	6	6	3	5
	totale M		35	33	29	28	19	28
	F	20-29	15	14	11	11	6	10
		30-39	14	11	11	11	11	10
		40-44	9	9	8	8	4	8
	totale F		38	34	30	30	21	28
	totali		73	67	59	58	40	56
	Viterbo	M	20-29	15	15	15	15	13
30-39			11	11	11	11	10	10
40-44			6	6	6	6	5	5
totale M			32	32	32	32	28	25
F		20-29	16	16	16	16	13	10
		30-39	15	15	15	15	13	10
		40-44	9	9	9	9	8	5
totale F			40	40	40	40	34	25
totali			72	72	72	72	62	50
Taranto		M	20-29	11	11	11	11	7
	30-39		10	10	10	9	8	10
	40-44		5	5	5	4	4	5
	totale M		26	26	26	24	19	26
	F	20-29	11	11	11	11	9	11
		30-39	10	10	10	10	9	10
		40-44	5	5	5	5	5	5
	totale F		26	26	26	26	23	26
	totali		52	52	52	50	42	52
	Gela	M	20-29	15	14	10	14	14
30-39			21	21	18	20	15	0
40-44			14	14	12	14	14	0
totale M			50	49	40	48	43	0
F		20-29	24	23	19	24	20	0
		30-39	11	11	11	11	11	0
		40-44	8	8	6	8	8	0
totale F			43	42	36	43	39	0
totali			93	91	92	91	82	0
totale 4 aree			290	282	275	271	226	158

* IMT: spessore medio intinale / IMT: intima media thickness

Nota: 4 soggetti dell'area di Gela (4GF312Z, 4GM317Z, 4NM32Z, 4NF35Z) sono stati eliminati dallo studio e non sono inclusi in tabella in quanto risultanti di età superiore a 44 anni.

Note: 4 subjects of the Gela area (4GF312Z, 4GM317Z, 4NM32Z, 4NF35Z) were eliminated from the study and were not included in the table, since they were older than 44 years old.

Tabella 2. Tabella delle numerosità campionarie dei dati raccolti, stratificati per area, per sesso e per classi di età.

Table 2. Table of sample size of data collected, stratified by area, sex and age classes.

dei volontari selezionati, che in alcune occasioni hanno fornito in prima persona i contatti telefonici con gli assistiti. I medici curanti hanno ricevuto una specifica «Lettera al medico curante» (Allegato 2), contenente le informazioni utili e i contatti per le informazioni. Nel caso di Taranto i volontari sono stati reclutati a seguito della diffusione di notizie e riferimenti per i contatti a mezzo stampa. I media sono stati utilizzati anche a Gela, dove il tema del biomonitoraggio dell'arsenico era già conosciuto dalla comunità a seguito dello studio SEBIOMAG realizzato nel 2008-2009.

Ai donatori SEpiAs sono stati consegnati due moduli di consenso informato per spiegare le finalità dello studio: «Modulo di consenso informato per la donazione di sangue e urina» (Allegato 3); «Modulo di consenso informato per gli esami cardiovascolari» (Allegato

4). Nei moduli si specifica la richiesta di esprimere la volontà di ricevere o meno i risultati delle analisi personali effettuate, direttamente o al medico di famiglia.

Per la migliore informazione sul lavoro in corso sono state preparate due schede informative per il donatore («Scheda informativa per il paziente. Analisi del sangue e delle urine», Allegato 5; «Scheda informativa per il paziente per gli esami cardiovascolari», Allegato 6) da utilizzare nelle quattro aree di interesse, che contengono i riferimenti specifici dei responsabili delle attività di prelievo e di spedizione dei campioni in ciascuna area.

Una «Dichiarazione di assenza di conflitto di interessi» è stata compilata sia dal *principal investigator* (Allegato 7) sia dal responsabile di ciascuna delle UO (Allegato 8).

Unità Operativa	Referente	Sintesi dei compiti
UOC Coordinamento	Fabrizio Bianchi, IFC-CNR, Pisa	<ul style="list-style-type: none"> ■ coordinamento tecnico e scientifico ■ redazione materiale informativo e formazione ■ elaborazione dei dati ■ comunicazione dei risultati
UO1 AUSL Viterbo Regione Lazio	Domenico Spera, AUSL Viterbo Paola Michelozzi, Dip. Epidemiologia del SSR, ASL RME, Regione Lazio	<ul style="list-style-type: none"> ■ campionamento, prelievi e somministrazione del questionario ■ raccolta dati ambientali e sanitari e valutazione esposizione ■ partecipazione gruppo di lavoro scientifico
UO2 USL Amiata Regione Toscana	Riccardo Frazzetta, USL 7 zona Amiata Val D'Orcia Francesco Cipriani, Resp. Osservatorio epidemiologico ARS Toscana	<ul style="list-style-type: none"> ■ campionamento, prelievi e somministrazione del questionario ■ raccolta dati ambientali e sanitari e valutazione esposizione ■ partecipazione gruppo di lavoro scientifico
UO3 ASL Taranto ARPA Puglia	Sante Aldo Minerba, ASL Taranto Giorgio Assennato, ARPA Puglia	<ul style="list-style-type: none"> ■ campionamento, prelievi e somministrazione del questionario ■ raccolta dati ambientali e sanitari e valutazione esposizione ■ partecipazione gruppo di lavoro scientifico
UO4 ASP Gela Regione Sicilia	Salvatore Migliore, ASP Caltanissetta, Distretto di Gela Salvatore Scondotto, Dip. Osservatorio epidemiologico, Regione Sicilia	<ul style="list-style-type: none"> ■ campionamento, prelievi e somministrazione del questionario ■ raccolta dati ambientali e sanitari e valutazione esposizione ■ partecipazione gruppo di lavoro scientifico
UO5 IFC-CNR	Maria Grazia Andreassi, IFC-CNR, Pisa	<ul style="list-style-type: none"> ■ misurazione di marcatori cromosomici/molecolari, di suscettibilità, di danno genetico ed epigenetico nel sangue ■ partecipazione gruppo di lavoro scientifico
UO6 IGM-CNR	Ivana Scovassi, IGM-CNR, Pavia Claudia Prestipino, IGM-CNR, Pavia	<ul style="list-style-type: none"> ■ misurazione di marcatori di danno al DNA, di stress, di apoptosi nel sangue ■ partecipazione gruppo di lavoro scientifico
UO7 Fondazione S. Maugeri (FSM)	Claudio Minoia, Lab. misure ambientali e tossicologiche, FSM, Pavia	<ul style="list-style-type: none"> ■ speciazione dell'As in urina ■ partecipazione gruppo di lavoro scientifico
UO8 IFC-CNR Fondazione S. Raffaele	Rosa Sicari, IFC-CNR Pisa Girolamo Catapano Minotti, San Raffaele, Taranto	<ul style="list-style-type: none"> ■ misurazione marcatori di rischio cardiovascolare ■ partecipazione gruppo di lavoro scientifico

Tabella 3. Responsabilità e compiti delle Unità operative di SEpiAs. / **Table 3.** Responsibilities and tasks of SEpiAs Operating units.

Per facilitare il reperimento di volontari e l'identificazione dei luoghi di prelievo e visita sono stati preparati altri due strumenti informativi:

- un **volantino informativo**, con specifiche diverse per ciascuna delle quattro aree (Allegato 9);
- una **locandina**, con specifiche diverse per ciascuna delle quattro aree (Allegato 10).

Un ulteriore allegato al protocollo è l'«Accordo di collaborazione» che definisce la fase iniziale di SEpiAs (Allegato 11).

I donatori hanno compilato, con l'assistenza di una figura addestrata appositamente, un questionario per la raccolta delle informazioni rilevanti per l'interpretazione dei risultati strumentali. Il «Questionario» per i donatori (Allegato 12) è suddiviso nelle seguenti sezioni:

Sezione A. Dati personali - Dati anagrafici utili per la descrizione.

Sezione B. Condizioni ambientali - Localizzazione dell'abitazione di residenza rispetto a impianti industriali (inclusi discariche e inceneritori), abitazioni precedenti se residente da meno di 10 anni, tipo e stato dell'abitazione, presenza di animali domestici, uso di acqua per bere e altri usi domestici.

Sezioni C e D. Attività lavorativa ed esposizione ad agenti chimici e fisici - Tipo di lavoro svolto nel passato e nel presente, tipo di esposizioni lavorative croniche e acute ad agenti tossici (viene proposta una lista).

Sezioni E e F. Abitudini individuali - Fumo (attivo e passivo) e alcol, da utilizzare come classici confondenti o modificatori di effetto rispetto a eventi principali (marcatori) o secondari (condizioni, sintomi, fattori di rischio, attività ricreative).

Sezione G. Storia medica - Richiesta di elenco di malattie e condizioni cliniche diagnosticate dal medico, allergie, sintomi respiratori e cardiovascolari, uso di farmaci.

Sezione H. Dieta - Consumo di cibi (domande su elenco), con specificazione di quantità, frequenza, luogo e modalità di produzione, adesione a diete e perdita di peso.

Sezioni I e J. Storia riproduttiva - Per le donne è dato rilievo alla storia degli esiti delle gravidanze precedenti e sono richieste informazioni sull'allattamento. Per gli uomini, sono richieste informazioni su sterilità o infertilità.

Sezione K. Scheda su percezione di pericoli e rischi - A valle della definizione di pericolo e rischio si richiede di attribuire priorità a fattori antropici e naturali, alla loro presenza nell'area, ai mezzi d'informazione abitualmente consultati, al giudizio sull'ambiente di vita.

Sezione L. Scheda ambulatoriale - Una scheda compilata in sede di prelievo (riuscita del prelievo, eventuale motivazione del rifiuto) con peso e altezza misurati al momento della somministrazione. Ciascuna variabile del questionario è stata descritta per area e per sesso (Allegato 13).

DETTAGLI SULLE QUATTRO AREE IN STUDIO

Nell'Allegato 15 sono riportate le relazioni complete, redatte da ciascuna UO, contenenti la caratterizzazione ambientale e sanitaria delle aree in studio; i seguenti paragrafi offrono una descrizione sintetica di tali relazioni.

Va premesso che la direttiva 98/83/CE, in vigore dal 2003, impone per l'arsenico nelle acque potabili il valore limite di 10 µg/l. Tra il 2003 e il 2009 sono state concesse all'Italia 2 deroghe a 50 µg/l e nel 2010 una terza deroga a 20 µg/l per quattro Regioni (Toscana, Lombardia, Lazio e Umbria).

U01 - Comuni di Civita Castellana e Ronciglione (Viterbo, Lazio)

Caratterizzazione

L'area in studio è costituita dai comuni di Civita Castellana (16.156 residenti) e Ronciglione (8.347 residenti) ed è interessata da inquinamento da arsenico nelle acque potabili di origine naturale o antropica (figura 1).

Dati ambientali

I campionamenti di ARPA Lazio sulle acque potabili (periodo 2005-2010) mettono in evidenza valori medi di arsenico superiori a 20 µg/l nei comuni di Civita Castellana e di Ronciglione. A Ci-

vita Castellana, su 127 prelievi la concentrazione media di arsenico nelle acque era di 29,5 µg/l con un massimo di 71 µg/l; a Ronciglione la concentrazione media di arsenico su 50 prelievi era 80,4 µg/l con un massimo di 350 µg/l.

Dati sanitari

In ambedue i comuni si osservano eccessi di mortalità (valutati come rischi relativi [RR], calcolati utilizzando come riferimento i comuni della provincia di Viterbo con concentrazioni di As_i <10 µg/l).

Civita Castellana (solo tra i maschi):

- malattie respiratorie (RR=2,48), in particolare per le BPCO (RR=1,58);
- tumore del polmone (RR=1,64).

Ronciglione:

- malattie del sistema circolatorio (maschi RR=1,18; femmine RR=1,11);
- malattie ischemiche del cuore (maschi RR=1,18);
- malattie respiratorie (maschi RR=1,37; femmine RR=1,46);
- BPCO (maschi RR=1,82);
- diabete (maschi RR=2,20; femmine RR=2,33);
- tumori maligni del polmone (maschi RR=1,45);
- tumori maligni della vescica (maschi RR=2,66).

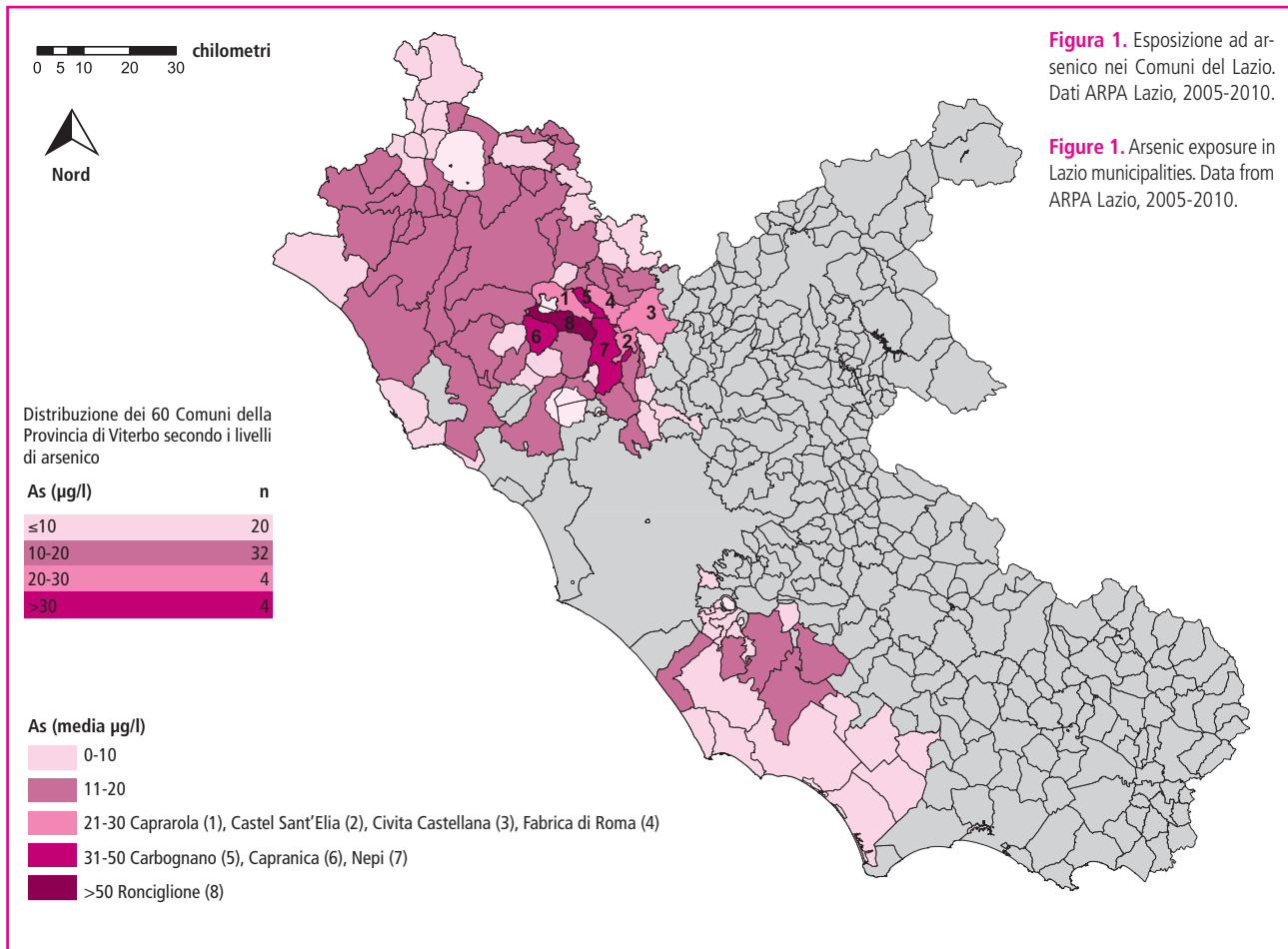


Figura 1. Esposizione ad arsenico nei Comuni del Lazio. Dati ARPA Lazio, 2005-2010.

Figure 1. Arsenic exposure in Lazio municipalities. Data from ARPA Lazio, 2005-2010.

U02 - Comune di Abbadia San Salvatore (Amiata, Toscana)

Caratterizzazione

L'area in studio, costituita dal Comune di Abbadia San Salvatore, si colloca nell'area amiatina, caratterizzata da importanti giacimenti minerali, da fenomeni naturali geotermici e da attività di produzione di energia elettrica mediante la coltivazione dei fluidi geotermici. L'area è caratterizzata da livelli di arsenico nelle acque potabili tali da indurre alcuni Comuni a far ricorso a richieste di deroga ai limiti normativi (figura 2).

Dati ambientali

Suolo. Secondo lo studio effettuato dall'Università di Siena nel 2008 la presenza di arsenico, boro e zolfo nei suoli dell'area amiatina è dovuta alla natura del substrato roccioso e non è rilevabile, per tali elementi, un'influenza da parte delle emissioni in atmosfera delle centrali geotermoelettriche nell'area di Bagnore e di Piancastagnaio.

Acque potabili. La zona amiatina presentava elevati livelli di arsenico nelle acque, ma in seguito all'installazione di impianti di abbattimento e tecniche di diluizione l'acqua potabile presenta caratteristiche sanitarie migliori rispetto alla fonte di approvvigionamento, in linea con quanto richiesto dalla normativa.

Emissioni centrali geotermoelettriche. Si rilevano emissioni quantitativamente significative di anidride carbonica, di acido sol-

fidrico e di ammoniaca, le quantità di arsenico rilasciate sono molto basse. Tra il 2000 e il 2007 si assiste a una forte riduzione delle emissioni di acido solfidrico e di mercurio, attribuibile all'installazione degli impianti di abbattimento di mercurio e idrogeno solforato (AMIS).

Qualità dell'aria. L'Agenzia regionale per la protezione dell'ambiente toscana (ARPAT) riporta livelli medi di concentrazione dei vapori di mercurio molto inferiori rispetto sia al valore guida OMS per la tutela sanitaria (1.000 ng/m³ come media annuale) sia al più restrittivo MRL dell'Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR: 200 ng/m³). Per l'acido solfidrico si evidenziano due superamenti del valore guida per la tutela sanitaria OMS (concentrazione media giornaliera pari a 150 µg/m³) determinando una persistente condizione di inquinamento olfattivo. Per gli altri inquinanti (PM10, SO₂, NO₂, CO) le concentrazioni sono sempre molto inferiori ai valori di riferimento stabiliti dalla normativa.

Dati sanitari

Le analisi di mortalità (2000-2006), effettuate nell'ambito del Progetto geotermia, (Studio geotermia. Progetto di ricerca epidemiologica sulle popolazioni residenti nell'intero bacino geotermico toscano, 2010), sono state aggiornate da ARS fino al 2009 e rivelano eccessi per:

- malattie infettive e parassitarie tra i maschi (SMR=283,9);
- tutti i tumori tra i maschi (SMR=126,4);

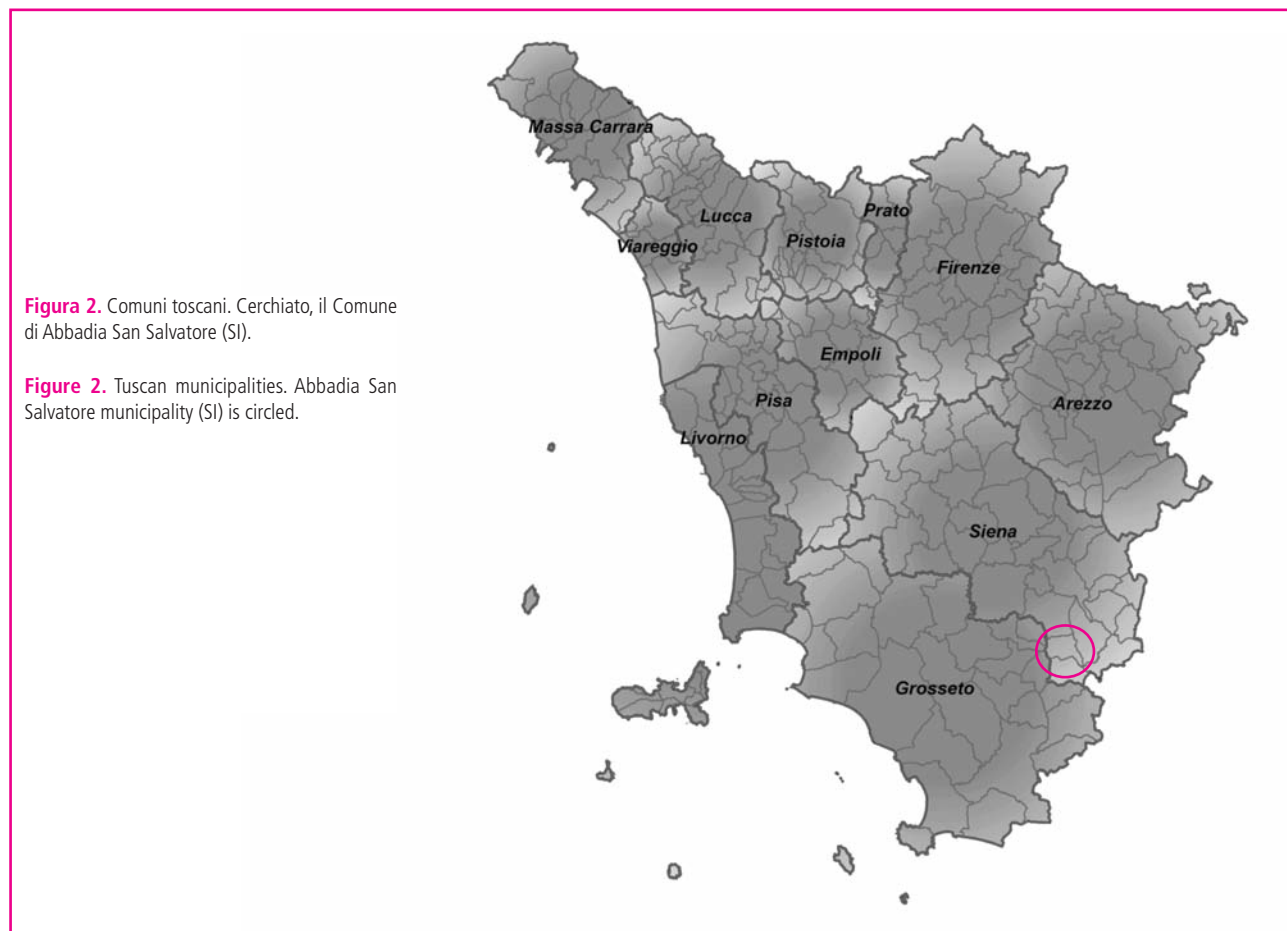


Figura 2. Comuni toscani. Cerchiato, il Comune di Abbadia San Salvatore (SI).

Figure 2. Tuscan municipalities. Abbadia San Salvatore municipality (SI) is circled.

- tumori maligni della prostata (SMR=166,1);
- malattie del sistema nervoso tra i maschi (SMR=163,9);
- malattia ipertensiva tra le femmine (SMR=192,2);
- malattie dell'apparato respiratorio tra i maschi (SMR=149,6);
- malattie respiratorie acute tra i maschi (SMR=196,5);
- polmonite tra i maschi (SMR=191,4);
- pneumoconiosi tra i maschi (SMR=359,4);
- malattie dell'apparato digerente tra le femmine (SMR=173,1);
- insufficienza renale acuta e cronica tra le femmine (SMR=223,5);
- traumatismi e avvelenamenti tra le femmine (SMR=162,0).

Le analisi sui ricoverati (2004-2006), aggiornate da ARS fino al 2011, evidenziano eccessi per:

- malattie infettive e parassitarie tra i maschi (SHR=165,7);
- tubercolosi tra le femmine (SHR=393,0);
- malattia ipertensiva tra i maschi (SHR=191,9);
- malattie respiratorie acute (maschi: SHR=152,8; femmine: SHR=172,0);
- polmonite (maschi: SHR=152,8; femmine: SHR=192,9);
- MPCO (maschi: SHR=292,5; femmine: SHR=220,4);
- BPCO (maschi: SHR=335,7; femmine: SHR=238,2);
- malattie dell'apparato digerente (maschi: SHR=130,0; femmine: SHR=126,3);
- malattie genitourinarie tra i maschi (SHR=125,8).

U03 - Comune di Taranto (Puglia)

Caratterizzazione

L'area di Taranto è definita «a elevato rischio ambientale» ed è caratterizzata da vari insediamenti che costituiscono possibili sorgenti di inquinamento ambientale (figura 3):

- un impianto di raffinazione;
- un cementificio;
- un inceneritore (Massafra);
- diverse centrali elettriche;
- i cantieri navali;
- un porto mercantile;
- l'arsenale militare;
- lo stabilimento siderurgico ILVA comprendente la produzione di coke, con vasti depositi minerali localizzati a ridosso dell'abitato cittadino.

Dati ambientali

Emissioni di arsenico. Per quanto riguarda le matrici aria e acqua, le dichiarazioni INES/EPTR (Inventario Nazionale delle Emissioni e loro Sorgenti/European Pollutant Release and Transfer Register) nel periodo 2003-2010 mostrano per la provincia di Taranto un andamento discordante nelle due matrici: si registra una tendenziale riduzione del trend emissivo di As nell'acqua, con un

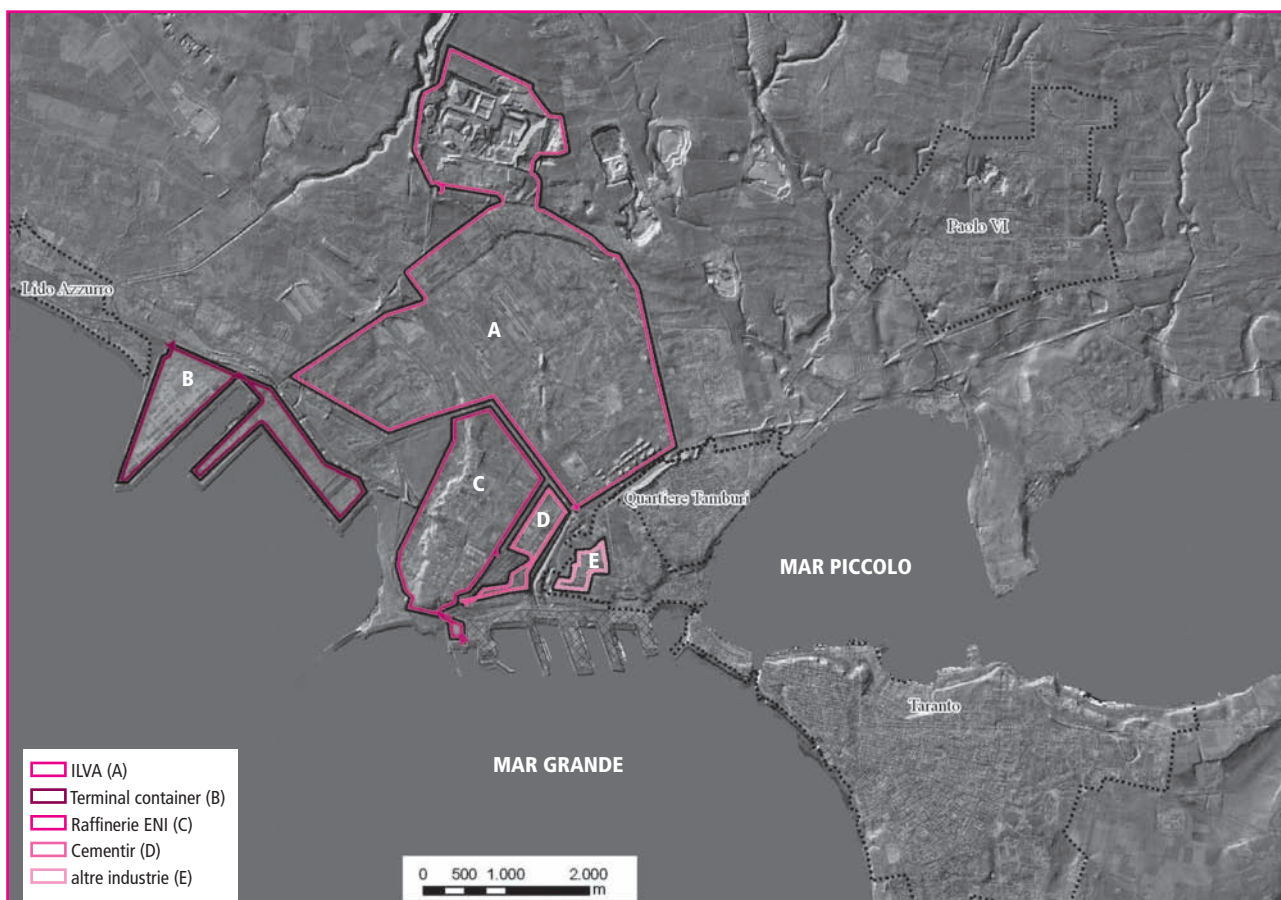


Figura 3. Insediamenti industriali e urbani di Taranto.
 Figure 3. Industrial and urban settlements of Taranto.

plateau negli ultimi anni, laddove nell'aria si osserva a partire dal 2006 un sensibile incremento. In particolare, si può osservare che il dato emissivo in atmosfera della provincia di Taranto per il periodo 2006-2010 rappresenta dal 70 al 100% di quello dell'intera Regione.

Dati sanitari

La popolazione di Taranto esposta alle emissioni industriali mostra un quadro sanitario compromesso. La procedura di *risk assessment* nell'area di Taranto attribuisce gran parte degli eccessi agli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e in particolare al benzo[a]pirene (circa 87% del rischio cancerogeno totale per via inalatoria). La stima del rischio cancerogeno per via inalatoria attribuito all'arsenico emesso dallo stabilimento siderurgico ILVA risulta inferiore a 1:100.000 anche in prossimità dell'area industriale; il 2,7% del rischio cancerogeno totale per via inalatoria è attribuito all'arsenico.

I dati di monitoraggio delle matrici aria e acqua potabile negli anni 2011 e 2012 mostrano una situazione confortante rispetto all'arsenico. I dati di biomonitoraggio umano evidenziano dosaggi urinari di As eccedenti i valori di riferimento, almeno per quanto riguarda il 95° percentile, a Statte, ma non nel Comune di Taranto.

U04 - Comuni di Gela e Niscemi (Sicilia)

Caratterizzazione

Il Comune di Gela comprende il sito di interesse nazionale (SIN) di Gela ed è incluso, insieme ai Comuni di Butera e Niscemi, nella «area a elevato rischio di crisi ambientale». Il SIN include sia aree a terra (private e pubbliche) sia superfici a mare (figura 4).

Le aree private all'interno del SIN sono:

- Syndial Spa (ex Agricoltura Spa in liquidazione, ex Enichem);
- EniMed, Eni Mediterranea Idrocarburi Spa (ex ENI – Divisione Exploration & Production, ex Agip mineraria);
- Raffineria di Gela Spa (ex AGIP);
- ISAF (Industria Siciliana Acido Fosforico SpA in liquidazione);
- Polimeri Europa Spa (ex Enichem).

Di questi, solo EniMed, Raffineria di Gela e Polimeri Europa hanno impianti in attività.

Le aree pubbliche all'interno del SIN sono:

- il Biviere di Gela;
- l'area marina;
- i tratti terminali dei torrenti Gattano, Acate e del fiume Gela;
- la discarica Cipolla.

Dati ambientali

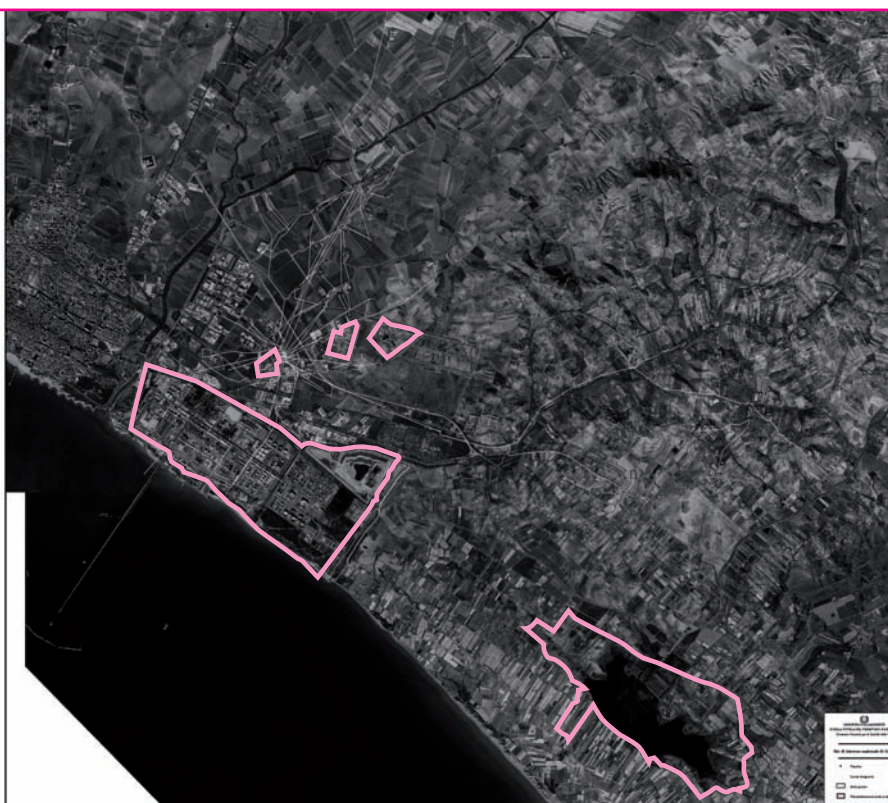
Acque sotterranee. Le sostanze pericolose presenti nell'acqua sotterranea, che mostrano elevati superamenti dei limiti normativi, sono prevalentemente metalli pesanti (arsenico, mercurio, nichel, manganese, ferro, piombo, alluminio, cobalto, selenio, vanadio, cadmio, manganese, ferro, cromo), idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e composti alifatici clorurati cancerogeni e BTEX (benzene, toluene, etilbenzene e xileni). L'arsenico ha mostrato concentrazioni massime fino a 25.000 volte il limite normativo.

Suolo. Molti parametri del suolo superano in modo rilevante le concentrazioni limite della normativa. L'arsenico ha mostrato un livello massimo di 34,24 mg/Kg, rispetto a una concentrazione soglia di contaminazione (CSC) di 20 mg/Kg.

Aria. Nell'ambito di un'indagine ambientale effettuata dall'Istituto sull'inquinamento atmosferico del CNR i valori medi di arsenico

Figura 4. Estensione del sito di interesse nazionale (SIN) che comprende il Comune di Gela (CL).

Figure 4. Extension of the national priority contaminated site (NPCS) which includes Gela municipality (CL).



rilevati nei mesi di gennaio, aprile, luglio e ottobre 2005 sono risultati compresi tra 0,3 e 1,3 ng/m³, sensibilmente al di sotto del valore soglia di 6 ng/m³. Nel 2010 la raffineria di Gela ha emesso in atmosfera 32 Kg di arsenico e 1,52 tonnellate nelle acque (fonte: E-PRTR).

Dati sanitari

Le analisi sono state effettuate confrontando i dati locali con due riferimenti, quello regionale del 2001 e quello locale riferito a 18 Comuni limitrofi all'area a rischio (L=riferimento locale; R=riferimento regionale).

Le analisi di **mortalità** per il periodo 2004-2011 hanno evidenziato eccessi per:

- tutte le cause (maschi: L-SMR=106,8; femmine: L-SMR=112,3; R-SMR=108,2);
- tutti i tumori (maschi: L-SMR=118,3; femmine: L-SMR=121,5);
- tumore dello stomaco tra i maschi (L-SMR=147,5);
- tumore della trachea, dei bronchi e del polmone tra le femmine (L-SMR=160,0);
- morbo di Hodgkin tra le femmine (L-SMR=1007,3);
- malattie del sistema circolatorio (maschi: L-SMR=114,2; femmine: L-SMR=113,2; R-SMR=114,2);
- malattie ischemiche del cuore tra le femmine (L-SMR=104,9);
- malattie cerebrovascolari (maschi: L-SMR=140,2; R-SMR=136,6; femmine: R-SMR=142,9);
- sintomi, segni e stati morbosi mal definiti (maschi: L-SMR=136,7; femmine: L-SMR=147,8; R-SMR=131,7);
- traumasmi e avvelenamenti tra le femmine (L-SMR=146,7).

Le analisi di **morbosità** per il periodo 2007-2011 hanno rilevato eccessi per:

- tutte le cause (maschi: L-SHR=113,9; R-SHR=120,2; femmine: L-SHR=114,6; R-SHR=118,6);
- malattie infettive e parassitarie (maschi: L-SHR=115,2; femmine: L-SHR=121,4; R-SHR=116,0);
- tutti i tumori (maschi: L-SHR=113,0; femmine: L-SHR=114,8; R-SHR=107,7);
- tumore dello stomaco tra i maschi (L-SHR=145,1);
- tumore della pleura tra i maschi (L-SHR=309,1);
- tumore del sistema nervoso centrale tra le femmine (L-SHR=200,6; R-SHR=162,7);
- mieloma multiplo tra i maschi (L-SHR=213,9; R-SHR=180,2);
- diabete mellito tra le femmine (R-SHR=124,1);
- malattie del sangue e degli organi ematopoietici (maschi: R-SHR=147,9; femmine: L-SHR=117,6; R-SHR=165,3);
- malattie psichiatriche (maschi: L-SHR=149,0; R-SHR=117,6; femmine: L-SHR=158,9; R-SHR=119,6);
- malattie del sistema nervoso (maschi: L-SHR=153,1; R-SHR=180,8; femmine: L-SHR=172,0; R-SHR=206,5);
- malattie del sistema circolatorio (maschi: L-SHR=126,0; R-SHR=127,1; femmine: L-SHR=141,7; R-SHR=155,4);
- malattie ischemiche del cuore (maschi: L-SHR=113,2; R-SHR=112,7; femmine: L-SHR=121,8; R-SHR=138,5);
- malattie cerebrovascolari (maschi: L-SHR=141,9; R-SHR=160,1; femmine: L-SHR=167,1; R-SHR=183,7);
- malattie dell'apparato respiratorio (maschi: L-SHR=108,7; R-SHR=123,1; femmine: L-SHR=110,1; R-SHR=126,5);

- asma (0-14 anni) tra i maschi (L-SHR=163,3);
- malattie acute dell'apparato respiratorio (maschi: L-SHR=109,1; R-SHR=139,6; femmine: L-SHR=112,8; R-SHR=148,1);
- malattie croniche dell'apparato respiratorio tra i maschi (R-SHR=117,9);
- asma tra i maschi (L-SHR=141,4);
- malattie dell'apparato digerente (maschi: L-SHR=122,1; R-SHR=135,7; femmine: L-SHR=134,2; R-SHR=138,6);
- malattie dell'apparato urinario (maschi: L-SHR=116,5; femmine: L-SHR=154,4; R-SHR=116,6);
- nefrosi tra le femmine (L-SHR=239,0);
- insufficienza renale (maschi: L-SHR=118,2; femmine: L-SHR=151,7; R-SHR=114,5);
- sintomi, segni e stati morbosi mal definiti (maschi: L-SHR=127,9; R-SHR=175,5; femmine: L-SHR=139,0; R-SHR=189,6);
- traumasmi e avvelenamenti (maschi: L-SHR=129,0; R-SHR=147,8; femmine: L-SHR=131,1; R-SHR=146,4).

MATERIALI E METODI DELLE UNITÀ OPERATIVE

Marcatori di esposizione (UO7)

In base al protocollo di studio, la UO7 aveva il compito di misurare le diverse forme di As nell'urina, conoscenza fondamentale per differenziare la quota inorganica presente come As(III) e As(V) dalle forme organiche presenti come acido monometilarsonico, acido dimetilarsinico, arsenobetaina e arsenocolina, molto diverse come livello di pericolosità per la salute umana in termini di cancerogenicità, tossicità, metabolismo. E' stato quindi sviluppato un metodo per la determinazione delle forme organiche e inorganiche dell'As nell'urina. In particolare, sono state spiegate le seguenti forme:

- acido dimetilarsinico [DMA(V)];
- acido monometilarsonico [MMA(V)];
- As(III);
- As(V).

La quantificazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di uno spettrometro di massa accoppiato induttivamente (DRC-ICP-MS) previa separazione cromatografica (HPLC).

Reattivi e soluzioni standard

- HNO₃ 65 % Suprapur (Merck, KgaA 64271 Darmstadt, Germany);
- H₂O bidistillata prodotta mediante sistema Milli Q Plus 185 (Millipore, Bedford, MA, USA);
- ELAN 6100 DRC SETUP/STAB/MASSCAL SOLUTION a titolo noto di 1 ppb di ²⁴Mg, ¹¹⁵In, ²³⁸U, ¹⁴⁰Ce e 10 ppb di ¹³⁷Ba (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT 06484, USA);
- NaOH, sodium hydroxide (SIGMA-ALDRICH);
- As, Certipur (Merck, KgaA 64271 Darmstadt, Germany);
- DMA, acido dimetilarsinico (SIGMA-ALDRICH Cacodylic Acid CAS 75-60-5) C₂H₇AsO₂;
- MMA, acido monometilarsonico (SIGMA-ALDRICH Monosodium Acid Methane Arsonate) CH₃AsO(OH)₂;
- As(III) (SIGMA-ALDRICH Arsenic III Oxide CAS 1327-53-3) As₂O₃;

■ As(V) (SIGMA-ALDRICH Sodium arsenate dibasic heptahydrate CAS 10048-95-0) $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Apparecchiature utilizzate

Il metodo prevede l'utilizzo di due tecniche strumentali: spettrometria di massa con sorgente a plasma induttivo e cella di reazione dinamica (DRC-ICP-MS) e cromatografia in fase liquida (HPLC).

HPLC

Configurazione strumentale. Per la separazione delle frazioni si è utilizzato un cromatografo Mod. Binary IC pump (series 250-Perkin Elmer).

Colonna. E' stata impiegata una colonna a scambio anionico Dionex AS9 SC 250 mm x 4mm (con precolonna AG7).

Fase mobile. Come eluente è stata utilizzata una soluzione acquosa di NaOH 50 mM, preparato per diluizione 1:2 da soluzione certificata 0,1M.

Flusso. E' stato utilizzato un flusso pari a 1,0 ml/min.

Condizioni cromatografiche. Per quanto riguarda la corsa cromatografica è stato impostato un programma in isocratica con 100% di NaOH 0,05M ($t_{\text{RDMA}}=2\text{min}$, $t_{\text{RAS(III)}}=3\text{min}$, $t_{\text{RMMA(V)}}=5\text{min}$, $t_{\text{RAS(V)}}=10\text{min}$).

Sulla base dei t_{R} sono state raccolte le frazioni da inviare successivamente all'analisi in DRC-ICP-MS.

DRC-ICP-MS

Configurazione strumentale. E' stato utilizzato uno spettrometro di massa con sorgente a plasma induttivo, Mod. ELAN DRC II (Perkin Elmer Sciex Instrument, Toronto, Canada), equipaggiato con i seguenti moduli:

- nebulizzatore a camera ciclonica e *Meinhard*;
- sorgente ICP, radiofrequenza 40 MHz, potenza massima 1.600 W. L'ICP funziona a pressione ambiente e a 6.000 K;
- cella di reazione dinamica (DRC);
- spettrometro di massa con analizzatore quadrupolare. Intervallo di massa da 5 a 270 amu, operativo a una pressione di 2×10^{-5} torr;
- coni in nichel (*skimmer e sampler*) posizionati nell'interfaccia fra ICP e spettrometro di massa;
- autocampionatore (Mod. AS-93 plus Autosampler, Perkin Elmer);
- personal computer con software ELAN.

I parametri operativi. Lo sviluppo di tecniche a elevata risoluzione e la disponibilità di una cella dinamica di reazione (gas alternativi), ha permesso di poter disporre di uno strumento con prestazioni sempre più elevate. In questo modo è stato possibile ridurre le interferenze di tipo spettroscopico (causate da ioni atomici o molecolari aventi la stessa massa nominale dell'analita di interesse) e quelle di tipo non spettroscopico (effetti interferenti da matrice) dovute alle analisi mediante ICP-MS.

Ottimizzazione dei parametri strumentali. L'ottimizzazione dei parametri strumentali è stata effettuata verificando la sensibilità degli isotopi ^{24}Mg , ^{115}In , ^{238}U (soluzione al titolo di 1 $\mu\text{g/l}$ dei tre analiti). E' stato inoltre misurato il rumore di fondo in corrispondenza della massa 220 e il livello dello doppie cariche (Ba^{++}) e degli ossidi (CeO^+). I risultati ottenuti sono conformi alle specifiche attese:

- Mg >6.000 cps/1ppb;
- In >30.000 cps/1 ppb;

- U >20.000 cps/1 ppb;
- background: 220 <2 cps;
- Ba^{++}/Ba <3%;
- CeO/Ce <3%.

I parametri operativi utilizzati sono quelli riportati nella **tabella 4**.

Preparazione dei campioni. I campioni di urina preventivamente decongelati sono stati diluiti 1:2 (v/v) con H_2O bidistillata e filtrati su GHP Acrodisc 13 mm con 0,45 μm GHP Membrane (*PALL Life Sciences*); 50 μl di campione sono stati iniettati nella colonna a scambio anionico (Dionex AS9 SC 250 mm x 4 mm) e le frazioni raccolte ai tempi di ritenzione sopra riportati, dopo opportuna diluizione con HNO_3 all'1%, sono stati avviati alla rilevazione strumentale in DRC-ICP-MS.

Preparazione delle curve di calibrazione. Le curve di calibrazione sono state preparate in matrice, utilizzando il metodo *standard addition*, poiché consente un migliore controllo della variabilità legata alla complessità della matrice biologica, che potrebbe influire negativamente sulla robustezza del metodo. I punti di calibrazione per ciascun composto (0,10-0,50-1,00-2,50-5-10-20 $\mu\text{g/l}$) sono stati preparati a partire da una soluzione standard a titolo noto di 10 mg/l per l'As totale e da soluzioni madri standard avente concentrazione 1 mg/ml ottenute sciogliendo ciascun sale in acqua bidistillata (per tutti i composti a eccezione di As (III), presente come ossido As_2O_3 , sciolto in NaOH a concentrazione 0,25 M).

Validazione del metodo. Per la messa a punto del metodo è stata effettuata una procedura di validazione allo scopo di verificare l'adeguatezza del metodo e l'attendibilità dei risultati. Le curve di calibrazione sono state preparate nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,1 e 20 $\mu\text{g/l}$. La loro valutazione ha evidenziato, per tutti i composti considerati, una buona linearità nell'intervallo di concentrazione individuato. I coefficienti di correlazione sono risultati i seguenti: 0,9998 (As); 0,9991 [MMA(V)]; 0,9996 [DMA(V)]; 0,9990 [As(III)]; 0,9994 [As(V)]. Il LOD (*limit of de-*

radiofrequenza	1.250 W
flusso argon	15 ml/min
flusso nebulizzatore	1,0 ml/min
flusso ausiliario	1,3 ml/min
flusso del campione	1,0 ml/min
nebulizzatore	camera dinamica di reazione
coni dell'interfaccia	nichel
scan mode	peak hopping
risoluzione	normale
tempo di lettura	120 ms
dwel time	30 ms
sweeps/readings	20
numero di repliche	3
ritardo di lettura	40 s
lavaggio autocampionatore	35 s
gas alternativo	metano
metodo di calibrazione	standard addition

Tabella 4. Parametri operativi utilizzati dall'Unità operativa 7.

Table 4. Operative parameters used by Operative unit 7.

tection) del metodo per le differenti forme dell'As sono risultate essere comprese nell'intervallo di concentrazione 0,1-0,2 µg/l. L'accuratezza, per quanto riguarda MMA(V), DMA(V), As(III) e As(V), è stata calcolata mediante il metodo delle aggiunte *spike di standard* certificati a concentrazione nota in matrice urinaria. Per quanto riguarda As totale è stato utilizzato il materiale certificato Lyphochek - Urine Metals Control Levels 1 - BIO-RAD. Il valore del recupero medio ottenuto è risultato compreso tra 90% e 105%. Maggiori dettagli sulle attività svolte dalla UO7 sono riportati nell'Allegato 14.

Biomarcatori molecolari e marcatori epigenetici (U05)

In base al protocollo di studio, la UO5 aveva come obiettivi:

- valutare l'influenza di polimorfismi funzionali di geni coinvolti nei meccanismi di detossificazione metabolica e riparazione del DNA nella modulazione di danno genetico ed epigenetico;
- identificare alterazioni epigenetiche mediante valutazione dello stato di metilazione globale e di geni *target* in cellule circolanti;
- valutare l'instabilità genetica con test del MN, biomarcatore cromosomico, accorciamento dei telomeri, come marcatori precoci di rischio di malattie cronico-degenerative.

Estrazione del DNA totale. Il DNA è stato estratto mediante l'utilizzo del Biorobot EZ1 (QIAGEN) che permette di estrarre il DNA sia da sangue sia da tessuto, da 6 campioni in un unico step che prevede:

- lisi dei campioni;
- legame del DNA a particelle magnetiche;
- lavaggio ed eluizione del DNA.

Valutazione quantitativa del DNA totale. Sono state preparate diluizioni 1:250 in acqua sterile del DNA estratto per la lettura spettrofotometrica alle lunghezze d'onda di 260 nm e di 280 nm. La misura consente la determinazione quantitativa della concentrazione del DNA e, dalla lettura a 280 nm per la stima delle proteine, si ricavano informazioni anche di tipo qualitativo. Infatti, il rapporto delle assorbanze a 260 nm e a 280 nm è considerato un indice di purezza del campione. Un valore accettabile di tale rapporto per il DNA è di 1,7-1,9. Le concentrazioni finali dei campioni sono state ricavate tramite la seguente formula:

$$\text{concentrazione finale} = \lambda_{260} \times \text{fattore di diluizione}$$

Analisi genetica. È stata condotta l'analisi genotipica per l'identificazione di polimorfismi funzionali in geni coinvolti nel metabolismo dell'arsenico, nei processi di detossificazione e nei processi di riparazione del DNA. In particolare sono stati genotipizzati i seguenti polimorfismi:

- AS3MT Met287Thr;
- XRCC1 Arg399Ser;
- hOGG1 Ser326Cys;
- delezione di GST-M1;
- delezione di GST-T1.

L'amplificazione dei frammenti di interesse per l'analisi dei polimorfismi è stata ottenuta mediante reazione a catena della polimerasi (PCR). Gli ampliconi ottenuti sono stati poi esaminati mediante metodica SBE (*single base extension*) utilizzando il *Genome Labtm*

SNPStart Primer Extension Kit (Beckman Coulter). Durante questa reazione al *primer* fiancheggiante il polimorfismo di interesse viene aggiunto un singolo nucleotide terminatore marcato con fluorocromo (ddNTP). I frammenti generati sono stati quindi analizzati mediante elettroforesi capillare con l'impiego del sequenziatore (Beckman Coulter CEQ 8000 Series Genetic Analysis System).

Analisi epigenetica. Si è analizzato lo stato di metilazione dei geni p53 e p16 e del gene p21 mediante analisi qualitativa con PCR metilazione specifica (MSP). Il DNA estratto è stato modificato mediante trattamento con bisolfito, che modifica le citosine non metilate in uracile lasciando le citosine metilate inalterate. Quindi, una reazione di PCR specifica permette di discriminare tra DNA metilato e non metilato tramite l'utilizzo di *primer* specifici.

Test MN. Le analisi relative al MN non sono state effettuate poiché sono state riscontrate difficoltà nell'acquisizione di campioni per un test specialistico come quello del MN.

Maggiori dettagli sulle attività svolte dalla UO5 sono riportate nell'Allegato 16.

Marcatori di danno al DNA, di stress cellulare e di apoptosi (U06)

Gli obiettivi della UO6 erano quelli di valutare:

- il danno al DNA tramite la presenza della forma fosforilata dell'istone H2AX;
- la sintesi di poli(ADP-ribosio) come risposta a condizioni di stress;
- l'apoptosi mediante vari parametri morfologici e biochimici.

Culture cellulari. Le cellule umane HeLa (derivate da carcinoma della cervice uterina) vengono coltivate in monostrato in terreno D-MEM (modificazione di Dulbecco del *minimum essential medium*) addizionato con 10% di siero fetale di vitello, 2 mM di sodio piruvato, 100 U/ml di penicillina e 0,1 mg/ml di streptomina (terreno completo) in termostato a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Una volta raggiunta la confluenza, si staccano le cellule mediante tripsinizzazione: si aspira il terreno di coltura, si lavano le cellule con 5 ml di PBS senza Ca²⁺ e Mg²⁺ (PBS: 140 mM NaCl; 1 mM KH₂PO₄; 2,7 mM KCl; 6 mM Na₂HPO₄); si aggiunge poi tripsina per agevolare il distacco delle cellule dal substrato a cui sono adese e la sospensione cellulare viene centrifugata a 1.500 rpm per 5 minuti. Il *pellet* viene risospeso con terreno completo e il numero di cellule determinate mediante camera contacellule di Bürker. Per i nostri esperimenti, le cellule HeLa sono state seminate su vetrini coprioggetto di 19 mm di diametro in *multiwell* da 12 pozzetti contenenti ognuno 5x10⁴ cellule. Ogni esperimento prevede un vetrino con cellule HeLa (controllo negativo); un vetrino con cellule trattate con 100 µg/ml di bleomicina (soluzione madre: 2 mg/ml in H₂O) per 24 ore (controllo positivo di danno al DNA), un vetrino con cellule trattate con 100 µM di etoposide (soluzione madre: 50 mM in DMSO) per 24 ore (controllo positivo di stress cellulare); entrambe le sostanze sono in grado di indurre apoptosi. I preparati vengono fissati con paraformaldeide al 2% per 15 minuti in ghiaccio e lavati due volte con PBS per 5 minuti. Le cellule così fissate sui vetrini coprioggetto nelle *multiwell* vengono conservate in 70% etanolo a 20°C.

Separazione dell'anello linfo-monocitario. Appena dopo il prelievo, il sangue (ca 5 ml) viene posto in provette contenenti anti-coagulante e lentamente stratificato su 5 ml di Ficoll con densità

1,077. Dopo centrifugazione a 2.000 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente si ottiene la separazione del sangue in tutti i suoi componenti, si preleva delicatamente l'anello linfomonocitario, che viene depositato in una provetta da 15 ml, e diluito con PBS fino a raggiungere il volume finale di 14 ml. La sospensione cellulare viene centrifugata a 1.100 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente, e il *pellet* risospeso delicatamente con 2,5 ml di PBS.

Allestimento dei vetrini. Per gli esperimenti di immunofluorescenza indiretta vengono utilizzati vetrini portaoggetto (76x26 mm) precedentemente puliti con etanolo, con un'estremità smerigliata per scrivere le informazioni relative al campione. Si depositano circa 20 µl di sospensione di linfociti nella zona centrale del vetrino. I vetrini si lasciano asciugare in posizione orizzontale a temperatura ambiente fino al giorno successivo e si conservano a temperatura ambiente fino al momento dell'uso o della spedizione. Per ogni campione si allestiscono circa 30 vetrini. Una volta arrivati nel nostro laboratorio i preparati vengono osservati al microscopio ottico per selezionare quelli più idonei per l'analisi dei marcatori.

Immunofluorescenza indiretta.

1) γ H2AX: fissazione per 4 minuti a 4°C con metanolo freddo, tre lavaggi con PBS, incubazione di 1 ora a temperatura ambiente in camera umida con l'anticorpo monoclonale di topo anti-fosforistone H2AX (Ser 139) contro γ H2AX (diluito 1:5000 in PBS contenente 2% skim milk, Millipore). Dopo tre lavaggi con PBS, i vetrini vengono poi incubati per 1 ora a temperatura ambiente in camera umida con l'anticorpo secondario TRITC (anti-topo rodaminato) diluito 1:50 in PBS, quindi lavati tre volte con PBS al buio. Segue poi la controcolorazione con Hoechst 33258 (0,1 µg/ml) e relativi lavaggi con PBS. Infine, i vetrini vengono montati con vetrino copri oggetto con 30 µl di Antifade, una soluzione costituita da 2 mM Tris-HCl pH 7,5, 90% glicerolo e 2% DABCO (1,4-diazobisciclo-(2,2,2) ottano) per prevenire il decadimento della fluorescenza; i bordi dei vetrini coprioggetto vengono sigillati con smalto per unghie e i preparati sono conservati in frigorifero fino all'osservazione al microscopio a fluorescenza.

2) PAR: fissazione con 2% paraformaldeide a 4°C per 15 minuti, 3 lavaggi con PBS in ghiaccio, permeabilizzazione con 0,1% Triton per 3 minuti sempre a freddo, 3 lavaggi con PBS a temperatura ambiente. Dopo incubazione di 30 minuti con PTN (PBS contenente 10% siero e 0,1% Tween-20) in agitazione, i vetrini sono incubati 30 minuti a 37°C in camera umida con l'anticorpo monoclonale di topo 10H (diluito 1:100 in PBS; Alexis), quindi lavati 5 volte con PBS a temperatura ambiente, e nuovamente incubati per 30 minuti a 37°C in camera umida con anticorpo secondario TRITC (anti-topo rodaminato, diluito 1:50 in PBS). A questo punto i vetrini, mantenuti sempre al buio, vengono lavati 5 volte con PBS e controcolorati con 0,1 µg/ml Hoechst 33258 come precedentemente descritto. La metodica applicata per visualizzare γ H2AX, PAR in linfociti è stata recentemente messa a punto nel nostro laboratorio.⁵⁹

3) Caspasi 3 attiva: i campioni vengono fissati con 2% paraformaldeide a 4°C per 15 minuti, lavati con PBS e incubati 1 ora a temperatura ambiente in camera umida con l'anticorpo policlonale di coniglio che riconosce la caspasi 3 attiva (diluito 1:100 in PBS; Life Technology), quindi lavati 3 volte con PBS e nuovamente incubati per 30 minuti a temperatura ambiente in camera umida con

anticorpo secondario FITC (anti-coniglio coniugato a Cy2, diluito 1:100 in PBS). A questo punto i vetrini, mantenuti sempre al buio, vengono lavati 5 volte con PBS e controcolorati con 0,1 µg/ml Hoechst 33258 come precedentemente descritto.

Osservazione al microscopio. I preparati vengono osservati con un microscopio a fluorescenza Olympus IX71; essi vengono eccitati con luce UV (con lunghezza d'onda compresa tra i 100 e 400 nm) per visualizzare l'Hoechst 33258 e luce rossa per osservare la fluorescenza dell'anticorpo secondario. I campioni si osservano con un ingrandimento 60X (obiettivo a immersione) e vengono fotografati mediante una camera digitale Cool SNAP_{ES} (Photometric). Le immagini sono acquisite con il software *MetaMorph* ed elaborate con il programma Adobe Photoshop 11.0.1[®]. Per ogni vetrino si contano dieci campi, considerando prima le cellule totali colorate con il colorante nucleare Hoechst 33258 e poi quelle positive, ossia con fluorescenza rossa. Tali conteggi sono effettuati su tutti i preparati (linfociti e cellule HeLa). Vengono eseguiti tre esperimenti indipendenti/campione/parametro.

Maggiori dettagli sulle attività svolte dalla UO6 sono riportate nell'Allegato 17.

Esami cardiovascolari (UO8)

La UO8 è dedicata ai marcatori di danno preclinico aterosclerotico: lunghezza del tratto Q-T del tracciato ecg, indici ultrasonografici di danno preclinico come lo spessore medio intimale carotideo, *compliance* arteriosa, score del calcio e grasso pericardico.

Acquisizione clip ecografiche. Le scansioni ecografiche vascolari carotidee e cardiache sono state ottenute seguendo le attuali relative linee guida.^{58,60} Ogni UO coinvolta nell'acquisizione delle immagini ecografiche era dotata di ecografo cardiovascolare comprensivo di sonda lineare e sonda cardiaca. Tutti gli operatori coinvolti sono stati istruiti riguardo l'impostazione dei singoli ecografi e la tipologia di immagini da acquisire. Al termine della fase di istruzione, gli operatori stessi sono stati certificati prima di essere autorizzati all'acquisizione delle immagini. Riguardo alla tipologia di immagini acquisite, per ogni paziente sono state previste clip della durata di almeno 10 secondi secondo il seguente schema:

- carotide comune destra con parte del primo tratto del bulbo carotideo (vascolare);
- carotide comune sinistra con parte del primo tratto del bulbo carotideo (vascolare);
- parasternale asse lungo normale (cardiaco);
- parasternale asse lungo con zoom su radice aortica (cardiaco);
- parasternale asse corto con zoom su valvola aortica (cardiaco);
- apicale 4 camere normale (cardiaco).

Elaborazione clip ecografiche. Le sequenze di immagini precedentemente descritte sono state estratte in formato DICOM e trasferite tramite protocollo FTP sicuro (sFTP) sul server appositamente realizzato dalla presente UO. Tali sequenze sono state analizzate da due distinti operatori, il primo dedicato al calcolo del biomarcatore IMT e il secondo dedicato al calcolo del biomarcatore CS. Il calcolo dell'IMT è stato ottenuto tramite applicazione del software Cardiovascular Suite⁶¹ che costituisce un *gold standard* per la valutazione automatica dello spessore medio intimale. Tramite tale software, l'operatore deve solo indicare la regione di interesse dove le immagini relative al distretto vascolare

in studio devono essere analizzate. Questo ha consentito di ottenere misure affidabili e altamente ripetibili. Il calcolo del CS è stato ottenuto tramite revisione delle immagini su *workstation* dedicata in accordo alla letteratura.⁵⁸

Maggiori dettagli sulle attività svolte dalla UO8 sono riportate nell'Allegato 18.

METODI DI ANALISI PER LA VALUTAZIONE DEI FATTORI ASSOCIATI ALLE DIVERSE FORME ARSENICALI

L'obiettivo di queste analisi è valutare i fattori associati a un aumento delle varie forme arsenicali in un campione di soggetti residenti nelle quattro aree in studio caratterizzate da diverse fonti di esposizione sia ambientale sia occupazionale, diversi stili di vita e differenti abitudini alimentari.

Le analisi di laboratorio hanno dosato le seguenti forme di As: As inorganico trivalente As(III), As inorganico pentavalente As(V), acido monometilarsinico (MMA), acido dimetilarsinico (DMA), complesso delle altre forme. L'analisi statistica ha in via preliminare considerato: $As_i = As(III) + As(V)$ e $As_i + MMA + DMA$, per interesse tossicologico e per la disponibilità di valori di riferimento suggeriti dalla Società italiana valori di riferimento (SIVR, <http://www.valoridiriferimento.it/>): per As_i da 0,1 a 1,5 µg/l; per $As_i + MMA + DMA$ da 2 a 15 µg/l.

Le analisi seguenti sono state effettuate utilizzando i pacchetti statistici R e STATA 13.^{62,63}

Distribuzione dei livelli di arsenico nel campione in studio

Le distribuzioni dei livelli di arsenico nel campione in studio sono risultate asimmetriche con diversi valori sotto il LOD o sopra il 95° percentile. Pertanto si è ritenuto più appropriato descrivere i campioni biologici di arsenico con la media geometrica (MG), la mediana, il 25°, il 75° e il 95° percentile (P25, P75, P95), la deviazione standard (DS) e gli intervalli di confidenza al 95% di probabilità della MG (IC95%). Per stimare in modo più accurato le MG, ai soggetti con misure di arsenico inferiori a 0,2 (LOD) è stato assegnato un valore uguale al LOD/2.⁶⁴ La MG è stata calcolata mediante la seguente formula:

$$MG = e^{\frac{\sum_{i=1}^n \ln x_i}{n}}$$

dove n è il numero di soggetti, x_i è la i -esima concentrazione di arsenico.

E' stata valutata la presenza di *outlier* per area e per sesso. Gli *outlier* sono stati definiti utilizzando diversi criteri:

- soggetti con concentrazione maggiore del P95 della distribuzione complessiva dell' As_i nelle quattro aree;
- soggetti che hanno valore di $As_i > 1,5$ µg/l (soglia di riferimento suggerita dalla SIVR);
- soggetti che hanno valore di $As_i + MMA + DMA > 15$ µg/l (soglia di riferimento suggerita dalla SIVR);
- soggetti che hanno valore di $As_i + MMA + DMA > 19,3$ µg/l (3,86 µg/l per As_i). Tale cut-off, o equivalente di biomonitoraggio (BE), come definito da Hays et al.,⁶⁵ identifica l'elevata prio-

rità nella valutazione di rischio nei processi di follow-up; la presenza di numerosi soggetti con arsenico inorganico al di sopra del cut-off è il presupposto per la messa a punto di un sistema di sorveglianza ambientale e sanitaria. Infatti, l'equivalente di biomonitoraggio (BE) è definito come la concentrazione di una sostanza chimica o dei suoi metaboliti in un mezzo biologico (sangue, urine o altro), che è coerente con una linea guida di esposizione basata sulla salute, ed è derivato integrando dati disponibili sulla farmacocinetica con valutazioni del rischio chimico esistenti. I dati di farmacocinetica chimico-specifici sono utilizzati per stimare le concentrazioni di biomarcatore che sono coerenti con il punto di partenza (PoD) usato per la determinazione di un valore guida di esposizione (come la dose di riferimento, RfD, o la dose giornaliera tollerabile, TDI), e con il valore guida dell'esposizione stessa. Questi valori (BEPoD) possono essere utilizzati come strumenti di screening per la valutazione dei dati biomonitoraggio per l'arsenico inorganico, e per fornire una valutazione delle sostanze chimiche che hanno grandi o piccoli margini di sicurezza rispetto alle valutazioni dei rischi e delle esposizioni esistenti. Questi valori non sono funzionali a un giudizio diagnostico per i potenziali effetti sulla salute umana.

E' stata valutata per area e per sesso la percentuale di As_i e di arsenico metilato sulla misura totale. Sono stati descritti gli indici di metilazione primario (MMA/ As_i), secondario (DMA/MMA) e totale (DMA/ As_i).

Attraverso un modello di regressione lineare multivariato si è valutato l'effetto delle interazioni tra zona, sesso ed età sulla concentrazione di arsenico. La significatività statistica delle interazioni è stata valutata tramite test del rapporto di verosimiglianza (confronto tra modello con interazioni e senza interazioni).⁶⁶

Analisi esplorativa di associazione tra fattori di esposizione e concentrazione di arsenico Dataset e tipologia delle variabili utilizzate nell'analisi esplorativa

Il progetto SEpiAs ha previsto la somministrazione di un questionario a tutti i soggetti del campione selezionato per lo studio. Variabili derivate dalle prime otto schede del questionario (A-H), più alcune variabili relative a polimorfismi di geni di enzimi coinvolti nel metabolismo dell'arsenico sono state utilizzate per eseguire un'analisi esplorativa dei dati raccolti. Tale analisi ha previsto l'utilizzo di diverse tecniche per l'individuazione di singole variabili, o di insiemi delle stesse, correlate con elevati livelli di arsenico nelle urine, sia nella sua forma inorganica (As_i) sia nella forma inorganica più le forme metilate ($As_i + MMA + DMA$). La tabella 5 riporta la totalità delle variabili selezionate per l'analisi esplorativa. Alcune variabili, raccolte dal questionario per costituire un archivio di dati da rendere disponibile anche per studi futuri, sono state scartate dall'analisi esplorativa perché ritenute poco informative ai fini dell'indagine sui livelli urinari di As_i . In particolare, le variabili per le quali venivano definite nel questionario più di due classi di esposizione sono state dicotomizzate come descritto nella colonna «Valore» (esposizione: sì/no, consumo: sì/no) in modo da rendere più bilanciati i campioni da confrontare. L'esposizione a fumo di sigaretta è stata dicotomizzata come segue: fumatori=soggetti che hanno dichiarato di fumare ancora o di

Variabile	Descrizione	Valore
Dati personali		
sesto F	«Il soggetto è di sesso femminile?»	dicotomica
età	età	20-29, 30-39, 40-44 (anni)
Z	indicazione di appartenenza alla zona dell'Amiata, di Viterbo, di Taranto o di Gela	Amiata, Viterbo, Taranto, Gela
Condizioni ambientali		
B8a	presenza (in passato) di umidità, muffe o funghi sulle pareti o soffitti di casa	dicotomica
B8b	presenza (attualmente) di umidità, muffe o funghi sulle pareti o soffitti di casa	dicotomica
RA	indicazione di appartenenza ai seguenti quartieri di Taranto: Tamburi-Lido Azzurro (T-LA), Città vecchia-Borgo (CV-B), Paolo VI (PVI) o altri (A)	A, PVI, CV-B, T-LA
Dist	distanza delle abitazioni dei soggetti del campione di Gela dalle seguenti coordinate: Lat 37.059475 – Long 14.273302	numerico (in Km)
Acqua		
B11.1	il soggetto beve abitualmente acqua da acquedotto pubblico	dicotomica
B11.2	il soggetto beve abitualmente acqua da pozzo privato	dicotomica
B11.3	il soggetto beve abitualmente acqua imbottigliata	dicotomica
B11.4	il soggetto beve abitualmente acqua di altro tipo (es: depurata, filtrata, dearsenificata)	dicotomica
B12.1	il soggetto cucina abitualmente con acqua da acquedotto pubblico	dicotomica
B12.2	il soggetto cucina abitualmente con acqua da pozzo privato	dicotomica
B12.3	il soggetto cucina abitualmente con imbottigliata	dicotomica
B12.4	il soggetto cucina abitualmente con acqua di altro tipo (es: depurata, filtrata, dearsenificata)	dicotomica
Attività lavorativa		
C1	«Il soggetto ha mai lavorato?»	dicotomica
C1.1	«Il soggetto lavora attualmente?»	dicotomica
Esposizione ad agenti chimici e fisici		
D1	«Il soggetto è mai stato esposto, nel suo lavoro, a polveri, sostanze chimiche, gas o radiazioni?»	dicotomica
D1a.1	«Il soggetto è mai stato esposto, nel suo lavoro, a silice e lana di vetro?»	dicotomica
D1a.2	«Il soggetto è mai stato esposto, nel suo lavoro, ad asbesto o amianto?»	dicotomica
D1a.3	«Il soggetto è mai stato esposto, nel suo lavoro, a berillio?»	dicotomica
D1a.4	«Il soggetto è mai stato esposto, nel suo lavoro, a polveri di metallo?»	dicotomica
D1a.5	«Il soggetto è mai stato esposto, nel suo lavoro, a derivati del petrolio?»	dicotomica
D1a.6	«Il soggetto è mai stato esposto, nel suo lavoro, a esalazioni auto, altri gas o fumi?»	dicotomica
D1a.7	«Il soggetto è mai stato esposto, nel suo lavoro, a solventi organici, tinture o acidi?»	dicotomica
D1a.8	«Il soggetto è mai stato esposto, nel suo lavoro, a polveri di legno o carbone?»	dicotomica
D1a.9	«Il soggetto è mai stato esposto, nel suo lavoro, a radiazioni ionizzanti?»	dicotomica
D1a.10	«Il soggetto è mai stato esposto, nel suo lavoro, a radiazioni non ionizzanti?»	dicotomica
D2	«Il soggetto ha mai avuto malattia o avvelenamento da esposizione a sostanze chimiche sul lavoro o per altre attività?»	dicotomica
D3	«Il soggetto ha mai lavorato in un impianto di trattamento rifiuti?»	dicotomica
D4	«Il soggetto ha mai lavorato in un'azienda agricola?»	dicotomica
D5	«Il soggetto ha mai utilizzato pesticidi al di fuori dell'orario di lavoro?»	dicotomica
D6	«Il soggetto ha mai lavorato in un'industria di prodotti chimici?»	dicotomica
D7	«Il soggetto ha mai lavorato con condensatori, bobine di motori elettrici, altri strumenti contenenti oli dielettrici o isolanti o fluidi idraulici?»	dicotomica
Fumo, alcol, caffè		
F1	«Il soggetto ha mai fumato?»	dicotomica
F4	«Il soggetto consuma almeno 1-2 bicchieri di birra al giorno?»	dicotomica
F5	«Il soggetto consuma almeno 1-2 bicchieri di superalcolici al giorno?»	dicotomica
F6.1	«Il soggetto consuma abitualmente aperitivi?»	dicotomica
F6.2	«Il soggetto consuma abitualmente misto-analcolici e superalcolici?»	dicotomica
F6.3	«Il soggetto consuma abitualmente grappa, whisky, cognac e similari?»	dicotomica
F7	«Quanto spesso il soggetto beve caffè?»	mai=1 qualche tazz./sett.=2 tutti i giorni=3
Storia medica		
G3	«Il soggetto assume abitualmente farmaci?»	dicotomica
G3a-h	«Il soggetto assume abitualmente: ormoni tiroidei (a), farmaci anticoncezionali (b), antistaminici (c), analgesici (d), gastrici (e), anti-colesterolo (f), anti-ipertensivi (g), anti-aggreganti (h)?»	dicotomica
Dieta		
H1a-z	«Il soggetto consuma almeno 1-2 volte a settimana i seguenti cibi: latte intero (a), latte scremato (b), yogurt (c), formaggio (e), mozzarella (f), burro (g), pollami (h), manzo (i), maiale (j), agnello (k), cavallo (l), prodotti a base di maiale (m), fegato (n), pesce (o), molluschi e crostacei (p), uova (q), verdure fresche (r), verdure cotte (s), frutta (t), oli e grassi vegetali (u), oli e grassi animali (v), cereali (w), pasta e pane (x), biscotti e dolci (y), vino (z)?»	dicotomica
H1a-zP	«Il soggetto consuma almeno 1-2 volte a settimana i seguenti cibi di produzione propria o locale: latte intero (a), latte scremato (b), yogurt (c), formaggio (e), mozzarella (f), burro (g), pollami (h), manzo (i), maiale (j), agnello (k), cavallo (l), prodotti a base di maiale (m), fegato (n), pesce (o), molluschi e crostacei (p), uova (q), verdure fresche (r), verdure cotte (s), frutta (t), oli e grassi vegetali (u), oli e grassi animali (v), cereali (w), pasta e pane (x), biscotti e dolci (y), vino (z)?»	dicotomica
H2	«Il soggetto fa uso di integratori alimentari?»	dicotomica
H2a-g	«Il soggetto fa uso dei seguenti integratori: ferro (a), Sali minerali (b), vitamine (c), antiossidanti (d), integratori per ossa/articolazioni (e), proteine (f), anti-colesterolo (g)?»	dicotomica
H3	«Il soggetto ha mai seguito diete particolari?»	dicotomica
H3a-d	«Il soggetto ha mai seguito diete: dimagranti (a), terapeutiche (b), disintossicanti (c), proteiche (d)?»	dicotomica
H4	«Il soggetto ha mai perso più di 10Kg nell'arco di sei mesi?»	dicotomica
L	«Il soggetto ha assunto nei tre giorni precedenti il prelievo pesci, molluschi o crostacei?»	dicotomica
Allattamento e premenopausa		
I10a	«Il soggetto sta allattando?»	dicotomica
J2	«Il soggetto è in premenopausa?»	dicotomica
Polimorfismi		
AS3MT	«Il soggetto ha almeno un allele mutato»	dicotomica
GSTT+	«Il soggetto è portatore del genotipo wildtype del gene GST-T1»	dicotomica
GSTM	«Il soggetto è portatore del genotipo wildtype del gene GST-M1»	dicotomica
Nota: Le variabili di tipo dicotomico hanno valori 0/1 riferiti alle risposte NO/SI. / Note: Dichotomous variables are set to 0 if the answer is NO and 1 if the answer is YES.		

Tabella 5. Variabili selezionate per l'analisi esplorativa. / **Table 5.** Variables selected for the explorative analysis.

avere smesso da meno di 6 mesi; non fumatori=tutti gli altri.

I consumi di alimenti nel questionario sono classificati come segue: mai/raramente, 1-2 volte alla settimana, 3-4 volte alla settimana, >4 volte alla settimana.

I fattori della dieta sono stati dicotomizzati come segue: non consumo per i soggetti che hanno risposto mai/raramente e consumo per tutti gli altri. Tutti gli altri fattori in studio sono già definiti dal questionario con risposta dicotomica (sì/no).

Per effettuare l'analisi esplorativa è stato selezionato un *dataset* di 267 soggetti, per i quali erano a disposizione dati completi relativi al questionario, ai polimorfismi e ai livelli di arsenico nelle urine.

Metodi esplorativi

Alberi decisionali

La fase preliminare dell'analisi esplorativa ha previsto l'impiego di alberi decisionali⁶⁷ con lo scopo di ottenere informazioni riguardanti l'associazione di variabili eventualmente responsabili di un livello elevato di As_i nelle urine.

Gli alberi decisionali rientrano tra le tecniche di *data mining* e sono utilizzati per costruire modelli predittivi a partire dall'insieme dei dati iniziali. Lo scopo dell'applicazione di alberi decisionali è classificare i soggetti costituenti il *dataset* nella loro esatta classe di appartenenza. Per effettuare tale studio, i 267 soggetti selezionati per l'analisi esplorativa sono stati suddivisi in tre classi secondo i seguenti criteri:

- classe A: $As_i > 3,86 \mu\text{g/l}$ (n=68);
- classe B: $1,5 \mu\text{g/l} < As_i < 3,86 \mu\text{g/l}$ (n=68);
- classe C: $As_i < 1,5 \mu\text{g/l}$ (n=131);

(vedere il paragrafo Distribuzione dei livelli di arsenico nel campione in studio, pg. 49, per la definizione dei valori di 1,5 e 3,86 $\mu\text{g/l}$). Su questa base sono stati sviluppati modelli di classificazione la cui affidabilità statistica è stata valutata in accordo ai seguenti valori, fissati su parametri scientificamente riconosciuti per la valutazione della performance di modelli di classificazione.⁶⁸

- accuratezza >60%, ovvero percentuale di soggetti correttamente classificati nella propria classe di appartenenza;
- $TPrate$ A (B e C) >0,50, ovvero frazione di soggetti di classe A (B e C) correttamente classificati in classe A (B e C).

Regressione multilineare

La seconda fase dell'analisi esplorativa ha previsto lo sviluppo di modelli di regressione multilineare, utilizzati per spiegare la relazione esistente tra la variabile dipendente (y) e più variabili (indipendenti) caratterizzanti gli individui oggetto di studio. In particolare, l'obiettivo di tale analisi stava nell'identificare variabili più significative mediante procedure *stepwise* da sottoporre ad analisi successive.

Sono stati sviluppati modelli di regressione considerando come variabile dipendente continua:

- il logaritmo naturale di As_i , $\ln(As_i)$;
- il logaritmo naturale di As_i più le sue forme metilate, $\ln(As_i + MMA + DMA)$.

La scelta delle variabili da inserire nel modello per la descrizione del fenomeno oggetto di studio (cioè per As_i e $As_i + MMA + DMA$) è stata affrontata con particolare cura, tenendo conto che:

- bisognerebbe includere nel modello solo quelle variabili indi-

pendenti la cui variazione apporta un contributo reale alla variazione di $\ln(As_i)$ e $\ln(As_i + MMA + DMA)$;

- alcune variabili indipendenti potrebbero risultare statisticamente significative e venire incluse nel modello solo per fattori dovuti al caso;

- alcune variabili che *a priori* sono considerate importanti per il fenomeno oggetto di studio potrebbero risultare statisticamente non significative ed essere così escluse dal modello.

Perciò, nell'ambito di ciascuna analisi sono stati sviluppati diversi modelli ed è stato poi selezionato quello ritenuto migliore tenendo conto della sua significatività statistica e della sua interpretabilità. Le variabili coinvolte nei modelli sono state selezionate secondo diversi metodi, utilizzati in sequenza o alternativamente:

- eliminazione di variabili con variabilità bassa (esposti <1%) o nulla;
- eliminazione delle variabili intercorrelate;⁶⁹
- eliminazione *backward* manuale;
- *stepwise regression* automatica;⁷⁰
- *correlation-based feature subset selection* (CfsSubsetEval): algoritmo che valuta l'efficacia di un sottoinsieme di variabili considerando l'abilità predittiva di ciascuno di essi (rispetto a y) ed eliminandone la ridondanza attraverso una selezione basata sulla intercorrelazione tra variabili.^{71,72}

I modelli di regressione multilineare sono stati selezionati secondo i seguenti criteri:

- numero massimo di variabili coinvolte nel modello $\leq 20\%$ del numero di soggetti del *modelling set*⁷³ dove con *modelling set* si intende l'insieme di soggetti utilizzato per lo sviluppo del modello;
- livello di significatività statistica di ciascuna variabile indipendente = $p < 0,2$. La scelta di una probabilità del 20% permette di essere meno conservativi nella scelta di variabili da approfondire nelle analisi di associazione tra fattori di esposizione e concentrazione di arsenico (basate su ipotesi *a priori*) riportate successivamente.

Analisi di associazione tra fattori di esposizione e concentrazione di arsenico

Lo scopo principale di questa analisi è stato valutare associazioni significative tra fattori di esposizione, di suscettibilità genetica e concentrazione di arsenico. L'analisi ha preso in considerazione sia fattori di esposizione riportati in letteratura come associati a concentrazioni significative di arsenico sia fattori risultati significativi dalle analisi esplorative. Si sono considerate solo le variabili che presentano variazioni di MG statisticamente significative ($p < 0,05$) o ai limiti della significatività ($p < 0,10$) e con un numero di casi maggiore o uguale a 3. Le variabili selezionate dal questionario riguardano:

- zona (Amiata, Viterbese, Taranto, Gela);
- sesso;
- classe di età (20-29, 30-39, 40-44 anni);
- consumo di acqua da bere (acquedotto, pozzo, acqua minerale imbottigliata);
- consumo di acqua per cucinare (acquedotto, pozzo, acqua minerale imbottigliata);
- esposizione lavorativa (esposizione a polveri, sostanze chimi-

che, gas o radiazioni, avvelenamenti da esposizione a sostanze chimiche sul lavoro, esposizione lavorativa in discarica o azienda agricola, esposizione lavorativa in industria chimica);

■ stili di vita (esposizione attiva a fumo di sigaretta, consumo di alcol (vino, birra, superalcolici e caffè);

■ storia medica;

■ dieta (consumo di latte, latticini, carne, pesce, crostacei, verdure, frutta, cereali, pasta);

■ consumo di alimenti di produzione propria e/o locale (latte, latticini, carne, pesce, crostacei, verdure, frutta, cereali, pasta);

■ polimorfismi genetici: AS3MT, GSTT e GSTM.

Per ciascun fattore di esposizione è stata valutata l'associazione con il livello sia di As_i sia di $As_i+MMA+DMA$. Le differenze significative sono state valutate mediante test t di Student per campioni indipendenti ($p < 0,1$).

Le analisi sono state svolte su tutto il campione e separatamente per area e per sesso. Tale stratificazione ha permesso di identificare fattori di esposizione significativi, specifici per area e per sesso. I soggetti con arsenico sopra il limite di riferimento di $3,86 \mu\text{g/l}$ (vedi Distribuzione dei livelli di arsenico nel campione in studio, pg. 49) sono stati caratterizzati in modo da conoscerne l'area di provenienza, il sesso, l'età, gli stili di vita, l'occupazione, le abitudini alimentari e la suscettibilità genetica. Le associazioni significative tra esposti ad arsenico inorganico e fattori di esposizione sono state valutate tramite test chi-quadro.

Fattori di confondimento o di modificazione di effetto

Sulla base dei risultati ottenuti, sia nella fase descrittiva sia in quella esplorativa sono stati identificati diversi fattori di esposizione potenzialmente associati all'aumento di arsenico. Per questi fattori è stato calcolato il rapporto tra MG dell'arsenico negli esposti/consumatori e MG nei non esposti/non consumatori (rapporto medie geometriche - RMG). Tale misura di associazione (RMG grezzo) è calcolabile mediante l'esponenziale dei coefficienti angolari dei modelli di regressione lineare semplice che hanno come variabile risposta (y) la forma arsenicale analizzata e come variabile esplicativa (x) il fattore di esposizione di interesse (preso uno alla volta, come per esempio: bere abitualmente acqua dell'acquedotto).

Attraverso un modello di regressione multilineare si è valutato l'effetto di interazione tra i polimorfismi e ciascun fattore di esposizione di interesse. La significatività statistica delle interazioni è stata valutata tramite test del rapporto di verosimiglianza. Le interazioni statisticamente significative sono risultate meno del 5% (163 su 3.420 test). Pertanto, in considerazione della bassa numerosità campionaria e della bassa percentuale di risultati significativi, si è preferito utilizzare modelli più parsimoniosi (modelli con un buon adattamento ai dati pur conservando una buona facilità di interpretazione) in grado di valutare gli effetti delle variabili di interesse aggiustati per la suscettibilità genetica (modelli additivi senza interazioni).

Si è calcolato il rapporto tra la MG dell'arsenico negli esposti/consumatori e la MG nei non esposti/non consumatori effettuando un aggiustamento delle stime per altri fattori associati all'aumento dell'arsenico. Tale misura di associazione (RMG aggiustato) è calcolabile mediante l'esponenziale dei coefficienti angolari dei modelli di regressione multilineare che hanno come

variabile risposta (y) la forma arsenicale analizzata, come variabile esplicativa (x) il fattore di esposizione di interesse (considerato uno alla volta) e come variabili di aggiustamento quelle risultate significativamente associate ai livelli di arsenico dalle analisi descrittive ed esplorative (consumo di pesce nei tre giorni precedenti il prelievo, area di appartenenza, sesso e polimorfismi AS3MT e GSTT).

Le analisi di regressione sono state svolte su tutto il campione e separatamente per area e per sesso. Tale stratificazione ha permesso di identificare quali fattori potessero essere specifici per area e per sesso in modo da valutare le differenze delle vie di esposizione. I risultati sono riportati in termini di percentuali di aumento di arsenico negli esposti rispetto ai non esposti. Per esempio, se la MG degli esposti è pari a $1,5 \mu\text{g/l}$ e la MG dei non esposti è $1 \mu\text{g/l}$, allora $RMG=1,5$ che si traduce in un aumento del 50% di arsenico negli esposti rispetto ai non esposti.

Per i fattori risultati statisticamente significativi si sono valutati:

■ l'entità dei RMG;

■ l'aumento della MG negli esposti rispetto ai non esposti;

■ superamento del limite di $1,5 \mu\text{g/l}$ e di $3,86 \mu\text{g/l}$ per As_i e di $15 \mu\text{g/l}$ e $19,3 \mu\text{g/l}$ per $As_i+MMA+DMA$, tra gli esposti.

In base ad alcune variabili del questionario e della suscettibilità genetica, selezionate sulla base della totalità delle analisi statistiche effettuate, sono stati caratterizzati i soggetti *outlier* con $As_i > 25 \mu\text{g/l}$ (P95 della distribuzione totale di As_i). È stata valutata, inoltre, l'associazione tra le variabili del questionario risultate più informative.

Analisi delle associazioni tra marcatori di danno al DNA e concentrazioni di arsenico

L'obiettivo principale di questa analisi è stato valutare le associazioni delle varie forme arsenicali con l'istone H2AX e con la proteina PARP-1. Tali marcatori di danno al DNA hanno mostrato una distribuzione normale e pertanto sono stati analizzati senza applicare una trasformazione logaritmica.

Mediante un'analisi di regressione semplice è stata valutata la differenza della MG sia di H2AX sia di PAR tra i soggetti esposti ad arsenico ($As_i \geq 3,86 \mu\text{g/l}$; $As_i+MMA+DMA \geq 19,3 \mu\text{g/l}$) e quelli non esposti. È stata inoltre effettuata un'analisi multilineare con l'obiettivo di valutare le associazioni tra l'arsenico e i suddetti marcatori di danno al DNA, tenendo conto di alcune variabili del questionario che sulla base dei risultati di letteratura sono riconosciute, o ipotizzate, come associate a stress ossidativo. Tali analisi sono state effettuate sul totale dei soggetti, per sesso e per area. Le differenze sono state testate mediante test t per dati indipendenti.

Analisi delle associazioni tra IMT e concentrazioni di arsenico

L'obiettivo principale di questa analisi è valutare la variazione dell'IMT in funzione di As_i e di $As_i+MMA+DMA$ considerando le soglie di $3,86 \mu\text{g/l}$ e $19,3 \mu\text{g/l}$, rispettivamente. Le analisi sono state eseguite in più fasi:

1. una prima analisi è stata eseguita considerando i valori di riferimento di IMT recentemente pubblicati⁷⁴ e la loro relazione con l'invecchiamento. In particolare, sono state con-

frontate le rette di regressione (in termini di coefficiente angolare e termine noto, separatamente per maschi e femmine) di IMT in funzione dell'età, globalmente e per ogni area rispetto ai valori di riferimento relativi a una popolazione sana e priva di fattori di rischio;

2. in una seconda analisi, l'IMT comune è stato messo in relazione con i livelli delle varie forme di arsenico, As totale, As_i, As_i+MMA+DMA e con gli indici di metilazione (*primary methylation index*: PMI=MMA/As_i; *secondary methylation index*: SMI=DMA/MMA).⁷⁵ Nell'ipotesi che una relazione potesse essere evidente solo al di sopra di una certa soglia di esposizione, la popolazione è stata dicotomizzata secondo la mediana della somma di As_i+MMA+DMA, pari a 7,68 µg/l;

3. in una terza analisi sono state valutate le associazioni di IMT con As_i e con As_i+MMA+DMA prendendo come cut-off i valori di 3,86 µg/l per As_i e 19,3 µg/l per As_i+MMA+DMA. L'IMT è risultato essere distribuito normalmente e pertanto è stato analizzato senza la trasformazione logaritmica. I risultati sono riportati come differenza tra la media di IMT dei soggetti esposti ad arsenico e il valore medio di IMT dei soggetti non esposti (differenza grezza). Tale analisi è stata effettuata sul totale dei soggetti,

per sesso e per area. Le differenze significative sono state testate mediante test t per dati indipendenti;

4. attraverso l'utilizzo di modelli di regressione multilineare è stato valutato l'effetto dell'arsenico sull'IMT aggiustato per area, per la suscettibilità genetica (AS3MT, hOGG1, XRCC1-399, GSTT e GSTM) e per altri fattori comunemente riconosciuti come fattori di rischio associati all'IMT (sesso, età, diametro della carotide); i risultati sono stati presentati in forma di differenza di IMT tra i soggetti esposti ad arsenico e quelli non esposti aggiustati per altri fattori di rischio (differenza aggiustata). Tali stime saranno confrontate con le stime grezze ottenute dai modelli di regressione descritti nel punto 3;

5. mediante un'analisi di regressione bivariata è stato valutato l'effetto congiunto dell'arsenico (sia As_i sia As_i+MMA+DMA) con la genetica utilizzando i cut-off indicati nei punti 3 e 4, e della suscettibilità genetica sull'IMT. Tale analisi ha permesso di valutare la presenza di interazioni significative tra polimorfismi ed esposizione ad arsenico. I risultati sono stati riportati sia in forma tabellare sia in grafici. Le differenze sono state testate mediante test t per dati indipendenti. Tale analisi è stata effettuata sul totale dei soggetti, per i due sessi e per area.

Capitolo 3 Risultati Results

ARSENICO NEI CAMPIONI BIOLOGICI

La descrizione della distribuzione di arsenico è stata effettuata su un campione di 271 soggetti, di cui 132 maschi (**tabella 6**). Per tre delle quattro aree (Viterbese, Amiata, Gela) sono stati reclutati più di 50 soggetti (numero previsto dal Protocollo di studio). Nella **tabella 7** è riportato il numero di soggetti stratificati per area e sesso con valori delle varie forme arsenicali non rilevabili dallo strumento (LOD).

Nell'Allegato 19 è presente la descrizione per area, per sesso e per classi di età dei campioni di arsenico totale suddiviso in As(III), As(V), MMA, DMA e altre specie arsenicali.

Rispetto alla soglia di riferimento per l'As_i di 1,5 µg/l, suggerita dalla SIVR, le MG risultano significativamente superiori nei campioni di Taranto e Gela, con eccessi maggiori per i maschi rispetto alle femmine; nel Viterbese la MG è superiore alla soglia nei maschi e di poco superiore nelle femmine, mentre nell'Amiata le MG sono inferiori in entrambi i generi. Valori sopra 1,5 µg/l risultano anche considerando le quattro aree nel loro insieme, in modo più pronunciato per gli uomini. I valori mediani sono sensibilmente più bassi e attenuano i superamenti sopra commentati che purtuttavia permangono per il campione totale di Gela e di Taranto, soprattutto per gli uomini (**tabella 8, grafico 1**).

I livelli medi di As_i+MMA+DMA sono inferiori a 15 µg/l (valore di riferimento SIVR) sul totale e in tutte le aree per entrambe i sessi, fatta eccezione per gli uomini di Gela che mostrano un lieve eccesso

(**tabella 9, grafico 2**). Le distribuzioni in ciascuna area dell'As_i (**grafico 1**) e dell'As_i+MMA+DMA (**grafico 2**) risultano asimmetriche e con elevata variabilità, più marcata a Taranto e a Gela.

I valori di As_i corrispondenti al P75 risultano più alti del limite SIVR di 1,5 µg/l sul totale delle quattro aree e molto superiori a Taranto e Gela, di poco superiori nel Viterbese, in particolare tra gli uomini, mentre sono inferiori nell'Amiata (**tabella 8, grafico 1**). Un analogo profilo risulta per As_i+MMA+DMA con l'eccezione di Viterbo, maschi e femmine (<15 µg/l) (**tabella 9, grafico 2**).

Tra i maschi del Viterbese si osservano 8 soggetti con una concentrazione di As_i maggiore di 3,9 µg/l (P75). A Taranto si osservano 6 maschi con valori di As_i superiori a 16,3 µg/l (P75) e 7 femmine con As_i superiore a 9,7 µg/l. A Gela si osservano 12 maschi con As_i superiore a 14,6 µg/l (P75) e 11 femmine con valore di As_i superiore a 14,7 µg/l.

I dati del P95 mostrano per l'As_i eccessi diversificati nelle quattro aree, con un livello più elevato sul loro totale e a Gela (>20 µg/l), particolarmente elevato a Taranto (>30 µg/l nei maschi e >100 µg/l nelle femmine). Considerando i soggetti con valori di As_i superiori al P95 delle distribuzioni per area e per sesso si notano in totale 18 soggetti, di cui 4 nell'Amiata (2 maschi), 4 a Viterbo (2 maschi), 4 a Taranto (2 maschi) e 6 a Gela (3 maschi). Un profilo simile si osserva per il P95 di As_i+MMA+DMA, che mostra valori particolarmente elevati a Gela e a Taranto, sia per i maschi sia per le femmine, e per i maschi nel Viterbese (**tabella 9, grafico 2**).

Tabella 6. Soggetti campionati per area e per sesso.

Totale campioni	Amiata	Viterbese	Taranto	Gela	Totale
maschi	28	32	24	48	132
femmine	30	40	26	43	139
totale	58	72	50	91	271

Table 6. Sampled subjects by area and sex.

Tabella 7. Numerosità dei soggetti, per area e per sesso, in base alle forme arsenicali non rilevabili dallo strumento.

Area	Sesso	As _{tot}	As _i <LOD	As(III) <LOD	As(V) <LOD	MMA <LOD	DMA <LOD	MMA+DMA <LOD
Amiata	M	0	5	5	7	1	0	0
	F	0	11	11	11	0	0	0
	totali	0	16	16	18	1	0	0
Viterbo	M	0	1	1	1	1	1	1
	F	0	0	0	2	0	0	0
	totali	0	1	1	3	1	1	1
Taranto	M	0	1	1	1	1	1	1
	F	0	0	0	1	0	0	0
	totali	1	1	1	2	1	1	1
Gela	M	0	0	0	0	0	0	0
	F	0	5	7	5	0	0	0
	totali	0	5	7	5	0	0	0
totale 4 aree		0	23	25	28	3	2	2

Table 7. Subjects' number, by area and sex, on the basis of arsenical forms not detectable by the instrument.

	Amiata M	Amiata F	Amiata totale	Viterbo M	Viterbo F	Viterbo totale	Taranto M	Taranto F	Taranto totale	Gela M	Gela F	Gela totale	Totale M	Totale F	Totale
n	28	30	58	32	40	72	24	26	50	48	43	91	132	139	271
MG	1,02	0,74	0,86	2,27	1,69	1,93	3,32	2,96	3,13	4,33	2,42	3,29	2,58	1,76	2,12
DS	3,37	2,94	3,15	3,01	3,06	3,04	4,43	5,15	4,73	3,26	4,99	4,15	3,78	4,29	4,08
P5	0,28	0,28	0,28	0,82	0,57	0,61	0,96	0,65	0,67	0,69	0,28	0,32	0,37	0,28	0,28
P25	0,54	0,28	0,28	1,14	1,16	1,14	1,36	1,08	1,17	1,89	0,81	1,20	1,12	0,76	0,90
mediana	0,70	0,64	0,67	1,58	1,36	1,43	1,72	1,53	1,58	2,65	1,41	2,31	1,74	1,25	1,51
P75	1,38	1,09	1,20	3,91	1,75	1,89	16,35	9,74	10,67	14,62	14,73	14,73	9,27	1,92	4,45
P95	19,21	8,55	15,56	16,07	29,12	16,07	36,85	103,89	103,89	23,85	27,10	25,12	23,85	28,27	25,41

Tabella 8. Statistiche descrittive per area e per sesso di As_i.

Table 8. Descriptive statistics on iAs by area and sex.

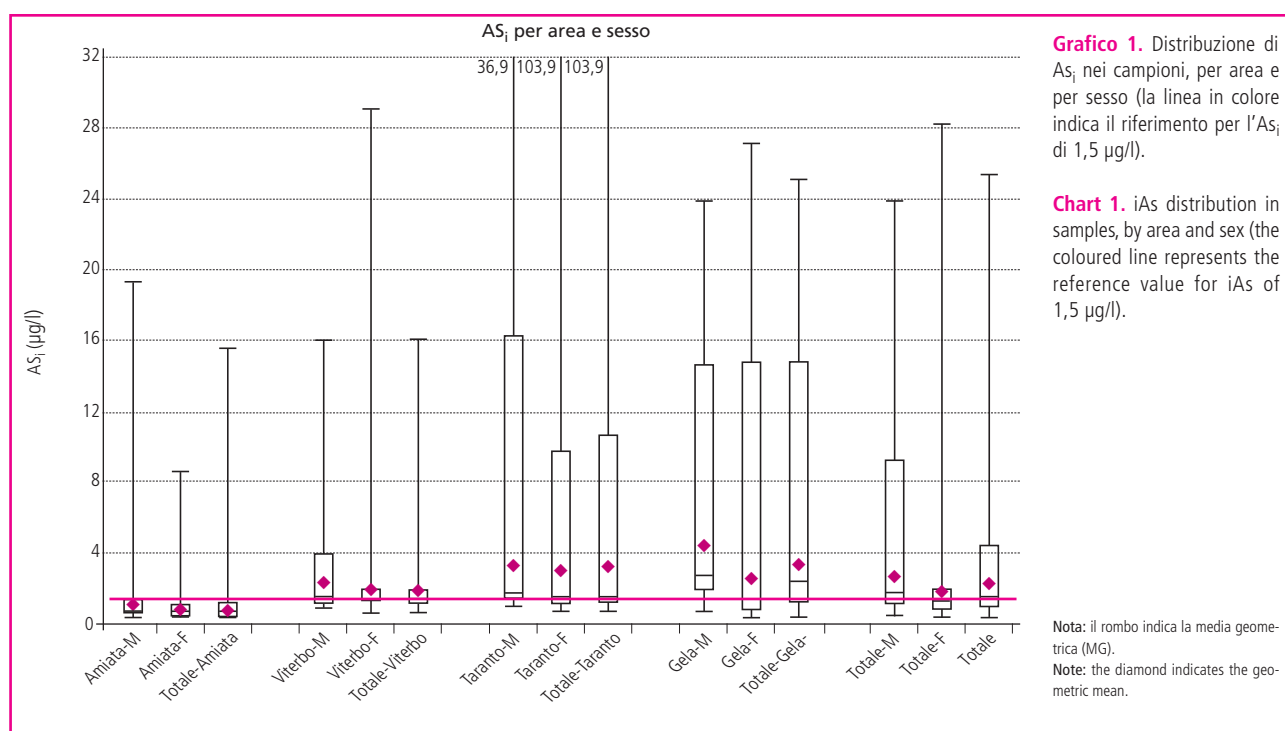


Grafico 1. Distribuzione di As_i nei campioni, per area e per sesso (la linea in colore indica il riferimento per l'As_i di 1,5 µg/l).

Chart 1. iAs distribution in samples, by area and sex (the coloured line represents the reference value for iAs of 1,5 µg/l).

In sintesi, i livelli di As_i e di As_i+MMA+DMA hanno mostrato una elevata variabilità all'interno delle aree e tra aree. La valutazione dei valori medi e di quelli più elevati delle distribuzioni dei quattro campioni mostra similitudini tra quelli di Gela e Taranto, che risultano spostati verso l'alto, una posizione intermedia del campione viterbese e valori più bassi in quello dell'Amiata.

Distribuzione dei casi secondo i vari cut-off

L'analisi delle concentrazioni urinarie di As_i e di As_i+MMA+DMA ha mostrato numerosi valori più elevati di quelli suggeriti dalla SIVR per la popolazione non esposta.

Nel campione SepiAs, 137 su 271 campioni, pari al 50,6% (61,4% tra i maschi e 40,3% tra le femmine) sono risultati più elevati della soglia superiore proposta per l'As_i (tabella 10). Le percentuali maggiori si osservano nell'area di Gela (67%), seguita da Taranto (58%) e dal Viterbese (48,6%), mentre nell'Amiata si registra un minor numero di casi. In tutte le aree emerge un sostanziale allineamento tra maschi e femmine, a eccezione di Gela, dove si evidenzia una percentuale nei maschi più elevata rispetto alle femmine.

I campioni con As_i+MMA+DMA >15 µg/l risultano il 25,1% nel complesso delle quattro aree, 30,3% tra i maschi e 21,1% tra le femmine (tabella 11).

Le percentuali più alte si trovano nel campione di Gela seguito da quello di Taranto, mentre i valori riscontrati nel Viterbese e nell'Amiata sono più bassi. Nelle aree di Amiata e Taranto emerge un sostanziale allineamento tra maschi e femmine mentre a Gela, e in modo più pronunciato nel Viterbese, si osserva una percentuale più alta tra i maschi. Da notare che tutti i soggetti hanno As_i >1,5 µg/l, quindi rappresentano un sottoinsieme di quello riportato nella precedente tabella 10.

Come riportato nella tabella 12, la ripartizione dei campioni con As_i >3,86 µg/l è sovrapponibile a quella ottenuta utilizzando il cut-off SIVR di 15 µg/l per As_i+MMA+DMA, a eccezione di un maschio in più nel Viterbese. L'allineamento tra i due cut-off di fonte diversa offre spazio a considerazioni sul disallineamento tra i due cut-off suggeriti dal SIVR per l'As_i e As_i+MMA+DMA, più protettivo nel primo caso, tanto da produrre un numero molto elevato di casi fuori limite.

	Amiata M	Amiata F	Amiata totale	Viterbo M	Viterbo F	Viterbo totale	Taranto M	Taranto F	Taranto totale	Gela M	Gela F	Gela totale	Totale M	Totale F	Totale
n	28	30	58	32	40	72	24	26	50	48	43	91	132	139	271
MG	4,70	3,66	4,13	8,90	6,91	7,73	12,87	12,68	12,77	16,29	9,59	12,68	10,35	7,47	8,76
DS	2,99	2,63	2,80	2,45	2,50	2,48	3,24	3,28	3,22	3,32	4,29	3,85	3,28	3,43	3,38
P5	1,30	1,32	1,26	3,67	1,99	2,23	3,54	2,62	2,72	2,36	1,19	1,46	1,73	1,42	1,50
P25	2,65	1,75	1,92	5,58	4,20	5,15	7,92	5,93	6,64	7,23	3,64	4,51	4,42	3,27	3,71
mediana	3,22	2,42	3,02	7,71	5,80	7,05	10,69	9,91	10,25	10,96	6,82	9,95	8,81	5,99	7,78
P75	8,78	8,27	8,27	14,50	11,07	11,83	31,33	23,15	28,68	55,07	37,12	45,65	28,21	12,47	16,37
P95	37,37	26,92	32,49	42,58	46,04	42,58	72,79	155,91	155,91	88,68	90,08	89,07	73,37	90,08	86,28

Tabella 9. Statistiche descrittive per area e per sesso di As₇+MMA+DMA.

Table 9. Descriptive statistics on iAs+MMA+DMA by area and sex.

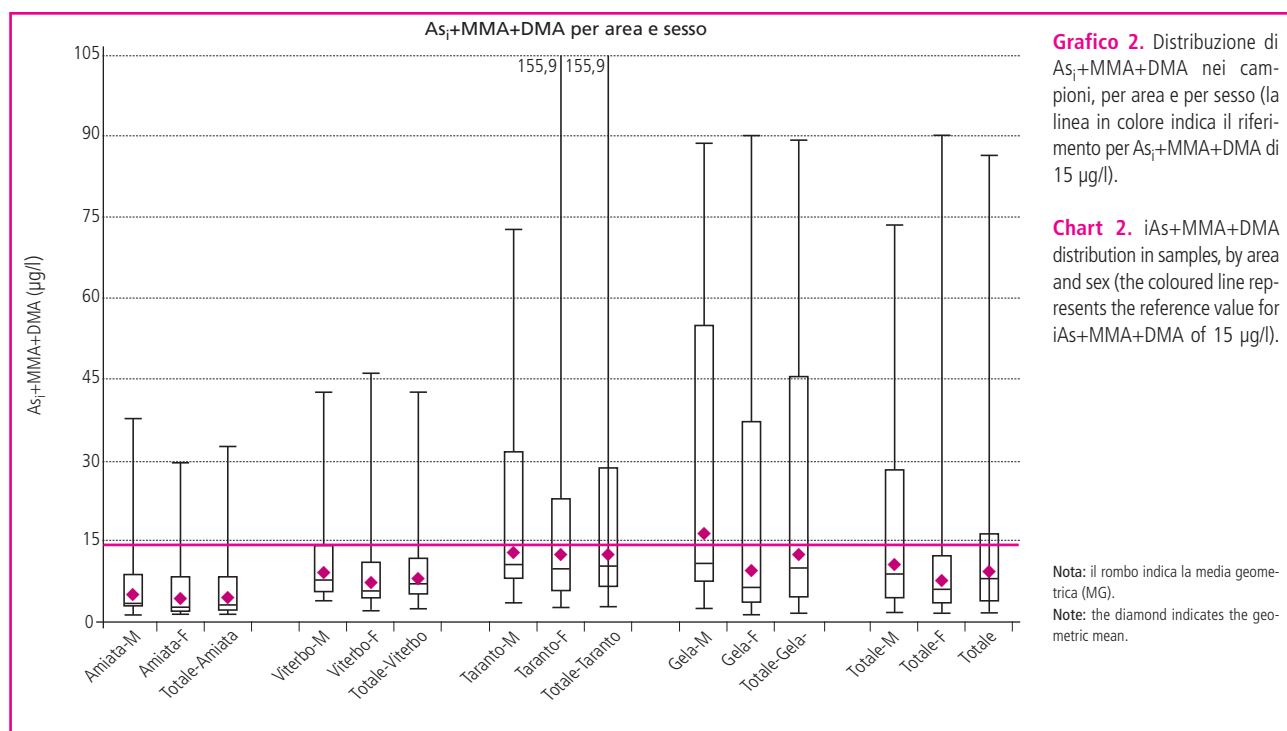


Grafico 2. Distribuzione di As₇+MMA+DMA nei campioni, per area e per sesso (la linea in colore indica il riferimento per As₇+MMA+DMA di 15 µg/l).

Chart 2. iAs+MMA+DMA distribution in samples, by area and sex (the coloured line represents the reference value for iAs+MMA+DMA of 15 µg/l).

Nota: il rombo indica la media geometrica (MG).
Note: the diamond indicates the geometric mean.

Tabella 10. Numero e percentuale di campioni con As₇>1,5 µg/l per area e per sesso.

Table 10. Number and percentage of samples with iAs > 1,5 µg/l by area and sex.

	Amiata N (%)	Viterbese N (%)	Taranto N (%)	Gela N (%)	Totale N (%)
maschi	7 (25,0)	18 (56,3)	15 (62,5)	41 (85,4)	81 (61,4)
femmine	5 (16,7)	17 (42,5)	14 (53,8)	20 (46,5)	56 (40,3)
totale	12 (20,7)	35 (48,6)	29 (58,0)	61 (67,0)	137 (50,6)

La percentuale è calcolata ponendo a rapporto il numero n di soggetti con As₇ > 1,5 µg/l rispetto al numero totale di soggetti campionati in quella classe, come riportato in tabella 6.

The percentage is calculated through the ratio between the n subjects with iAs > 1,5 µg/l and the total number of the subjects sampled in that class, as reported in table 6.

Tabella 11. Numero e percentuale di campioni con As₇+MMA+DMA > 15 µg/l per area e per sesso.

Table 11. Number and percentage of samples with iAs+MMA+DMA > 15 µg/l by area and sex.

	Amiata N (%)	Viterbese N (%)	Taranto N (%)	Gela N (%)	Totale N (%)
maschi	4 (14,3)	7 (21,9)	8 (33,3)	21 (43,8)	40 (30,3)
femmine	3 (10,0)	3 (7,5)	7 (26,9)	15 (34,9)	28 (20,1)
totale	7 (12,1)	10 (13,9)	15 (30,0)	36 (39,6)	68 (25,1)

La percentuale è calcolata ponendo a rapporto il numero n di soggetti con As₇+MMA+DMA > 15 µg/l rispetto al numero totale di soggetti campionati in quella classe, come riportato in tabella 6.

The percentage is calculated through the ratio between the n subjects with iAs+MMA+DMA > 15 µg/l and the total number of the subjects sampled in that class, as reported in table 6.

	Amiata N (%)	Viterbese N (%)	Taranto N (%)	Gela N (%)	Totale N (%)
maschi	4 (14,3)	8 (25,0)	8 (33,3)	21 (43,8)	41 (31,1)
femmine	3 (10,0)	3 (7,5)	7 (26,9)	15 (34,9)	28 (20,1)
totale	7 (12,1)	11 (15,3)	15 (30,0)	36 (39,6)	69 (25,5)

La percentuale è calcolata ponendo a rapporto il numero n di soggetti con As_i >3,86 µg/l rispetto al numero totale di soggetti campionati in quella classe, come riportato in tabella 6.
The percentage is calculated through the ratio between the n subjects with iAs >3,86 µg/l and the total number of the subjects sampled in that class, as reported in table 6.

Tabella 12. Numero e percentuale di campioni con As_i >3,86 µg/l per area e per sesso.

Table 12. Number and percentage of samples with iAs >3,86 µg/l by area and sex.

In questo sottoinsieme di campioni con valori oltre i cut-off sono emersi alcuni soggetti con valori particolarmente elevati di As_i e di As_i+MMA+DMA. Sebbene non esistano valori soglia minimi di rischio per la salute (*minimal risk level* - MRL) e tenendo in considerazione che la concentrazione nell'urina è solo un indicatore di esposizione a breve termine e non un indicatore di effetto, si ritiene comunque importante identificare i valori *outlier* emersi dall'analisi.

Scegliendo 25 µg/l come cut-off corrispondente al P95 della distribuzione complessiva dell'As_i nelle quattro aree, si ottiene:

■ i soggetti con livello di As_i >25 µg/l sono risultati 15 (5 maschi, 10 femmine) ripartiti in: 6 a Taranto (1 maschio, 5 femmine), 5 a Gela (2 maschi, 3 femmine), 3 nel Viterbese (1 maschio, 2 femmine), 1 nell'Amiata (1 maschio);

■ tra questi soggetti, 1 a Gela ha mostrato un valore >50 µg/l, altri 5 soggetti (3 a Taranto, di cui 1 maschio e 2 femmine; 2 femmine nel Viterbese) hanno mostrato valori >100 µg/l.

I risultati sopra descritti hanno implicazioni sia sul piano della comunità interessate sia sul piano dei singoli donatori partecipanti all'indagine. La caratterizzazione individuale dei soggetti *outlier* rientra nella caratterizzazione dei soggetti con As_i >3,86 µg/l in associazione a fattori di esposizione individuati all'interno del questionario.

Ripartizione delle specie di arsenico misurate sulla totalità dei soggetti per area e per sesso

Come riportato nella **tabella 13** e nel **grafico 3**, sul campione totale l'As_i rappresenta circa il 25,3% delle quattro forme rilevate

Zona-sesso	As(III) µg/l (%)	As(V) µg/l (%)	MMA µg/l (%)	DMA µg/l (%)	As _i +MMA+DMA µg/l (%)
Amiata-M	0,56 (12,3)	0,45 (9,9)	1,23 (27,2)	2,29 (50,6)	4,52 (100,0)
Amiata-F	0,38 (10,9)	0,35 (10,3)	0,91 (26,4)	1,81 (52,4)	3,46 (100,0)
Viterbo-M	1,33 (15,7)	0,91 (10,8)	1,61 (19,0)	4,62 (54,5)	8,47 (100,0)
Viterbo-F	0,97 (15,2)	0,66 (10,3)	1,20 (18,9)	3,57 (55,8)	6,41 (100,0)
Taranto-M	1,75 (15,5)	1,32 (11,7)	2,38 (21,1)	5,82 (51,6)	11,27 (100,0)
Taranto-F	1,52 (13,4)	1,28 (11,3)	2,13 (18,8)	6,41 (56,5)	11,34 (100,0)
Gela-M	2,17 (14,3)	1,94 (12,8)	2,29 (15,1)	8,76 (57,8)	15,17 (100,0)
Gela-F	1,36 (11,0)	0,96 (11,0)	2,02 (23,1)	4,43 (50,5)	8,77 (100,0)
totale M	1,39 (14,5)	1,11 (11,5)	1,86 (19,4)	5,24 (54,6)	9,59 (100,0)
totale F	0,96 (14,0)	0,73 (10,7)	1,48 (21,6)	3,68 (53,7)	6,85 (100,0)
totale	1,15 (14,2)	0,90 (11,1)	1,65 (20,5)	4,37 (54,2)	8,06 (100,0)

Tabella 13. Concentrazioni delle specie di arsenico misurate, sul totale dei soggetti e per sesso.

Table 13. Concentrations of arsenic species measured on the total of the subjects and by sex.

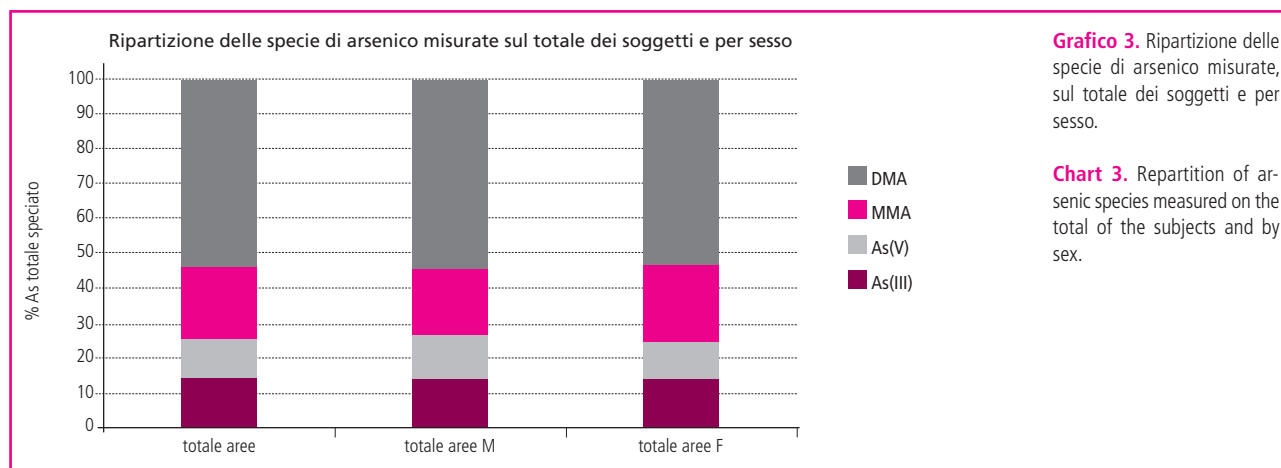


Grafico 3. Ripartizione delle specie di arsenico misurate, sul totale dei soggetti e per sesso.

Chart 3. Repartition of arsenic species measured on the total of the subjects and by sex.

[As(III), As(V), MMA, DMA], con leggera prevalenza tra i maschi (26%) rispetto alle femmine (24,7%); MMA rappresenta il 20,5%; DMA ha un peso del 54,2%, con tenui differenze tra maschi e femmine. Il peso percentuale dell'As_i e dell'MMA si posizionano nella zona alta dei range riportati in letteratura (rispettivamente 10%-30% e 10%-20%) mentre DMA è inferiore al range riportato tra il 60% e l'80%.⁷⁶ I valori di SEpiAs sono diversi da quanto rilevato recentemente nel Lazio, in cui il peso dell'As_i è riportato al 14%, dell'MMA al 13% e del DMA al 72%.⁷⁷ La distribuzione delle forme misurate mostra profili non molto dissimili nelle quattro aree, seppure siano da commentare alcune differenze tra aree e tra sessi: l'As_i pesa tra il 21,1% in Amiata-femmine e il 27,2% tra i maschi di Taranto e di Gela, e il campione di Viterbo in posizione intermedia con 25,5-26,5% in femmine e maschi. La forma MMA assume valori più elevati nel campione dell'Amiata (>25% in ambedue i sessi) e più bassa negli altri campioni, in particolare Gela-maschi (15%). La forma DMA assume un peso compreso tra il 50% nell'Amiata e il 58% a Gela-maschi (tabella 13, grafico 4).

Da notare che i valori percentuali rilevati nel campione del Viterbese sono differenti da quelli riportati recentemente nel Lazio,

che con 14%, 13%, 72% rispettivamente di As_i, MMA, DMA⁷⁸ mostrano un minor peso percentuale di As_i e MMA a vantaggio del DMA.

As totale e quattro specie misurate, «altre forme» stimate e rapporto sul totale

La concentrazione di «altre forme» calcolata per ciascun campione per differenza tra l'As totale misurato e le quattro specie misurate assommano a circa il 30% del valore dell'As totale, con peso maggiore nelle femmine rispetto ai maschi (tabella 14).

Il peso delle «altre forme» è molto variabile tra le aree e i due sessi, assumendo pesi tra il 27% e il 33% nei maschi dell'Amiata, nei maschi e nelle femmine del Viterbese e di Taranto, mentre risulta sensibilmente più elevato il peso tra i maschi di Gela e ancora più elevato tra le femmine dell'Amiata e di Gela. La proporzione di «altre forme» risultante nel Viterbese, al netto dei limiti insiti nella modalità con cui è stata stimata, risulta inferiore rispetto a quanto rilevato recentemente nel Lazio, dove la somma dell'As_i+MMA+DMA è riportata al 49% di tutte le specie di As misurate, o al 54% se si escludono i campioni con concentrazione di arsenobetaine maggiore di 50 µg/l⁷⁷ (tabella 14).

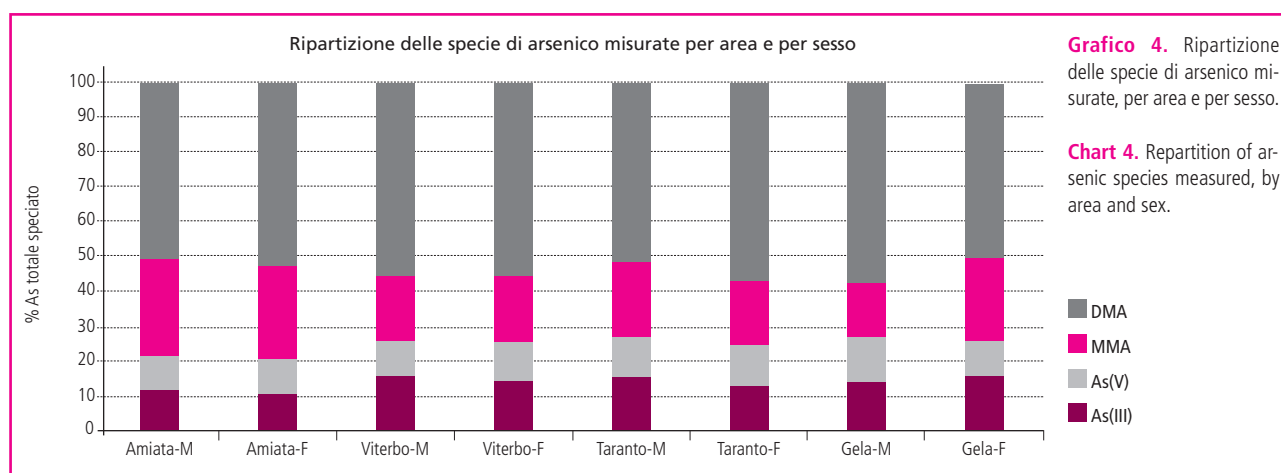


Grafico 4. Ripartizione delle specie di arsenico misurate, per area e per sesso.

Chart 4. Repartition of arsenic species measured, by area and sex.

Tabella 14. Concentrazioni di arsenico totale e quattro specie misurate, «altre forme» stimate e rapporto sul totale.

Table 14. Concentrations of total arsenic and of four arsenic species measured, «other forms» estimated and ratio on the total.

Zona-sesso	As _{tot} (a) µg/l	As _i +MMA+DMA (b) µg/l	Altre forme (c) µg/l	Rapporto (c/a) %
Amiata-M	6,22	4,52	1,70	27,3
Amiata-F	6,32	3,46	2,86	45,3
Viterbo-M	11,73	8,47	3,26	27,8
Viterbo-F	9,02	6,41	2,61	28,9
Taranto-M	16,89	11,27	5,62	33,3
Taranto-F	16,06	11,34	4,72	29,4
Gela-M	24,86	15,17	9,69	38,9
Gela-F	16,13	8,77	7,36	45,6
totale M	17,05	9,59	4,66	27,3
totale F	12,88	6,85	4,10	31,8
totale	14,76	8,06	4,36	29,5

(a) As totale misurato

(b) somma delle 4 specie misurate [As_i(III)+As_i(V)+MMA+DMA]

(c) valori medi della differenza tra (a) e (b) calcolata per ciascun soggetto; il valore medio ottenuto è diverso dalla differenza dei valori medi, per effetto delle determinazioni inferiori al LOD che sono state sostituite con il valore di 0,1414 corrispondente al LOD diviso la radice quadrata di 2, cioè 0,2/1,414.

(a) total As measured

(b) sum of the 4 species measured [iAs_i(III)+iAs_i(V)+MMA+DMA]

(c) mean values of the difference between (a) and (b) calculated for each subject; the mean value obtained is diverse from the difference of the mean values, due to the effect of the determinations less than LOD that have been replaces with the value of 0.1414 corresponding to LOD divided by the square root of 2, that is 0.2/1.414.

In sintesi, nelle diverse aree l'As_i rappresenta tra il 21% e il 27% dell'arsenico totale, con i valori inferiori riscontrabili tra le femmine dell'Amiata e quelli superiori tra i maschi di Taranto e Gela. L'MMA assume valori proporzionalmente superiori nei campioni dell'Amiata, mentre il DMA presenta percentuali più simili nei diversi campioni, comprese in un range tra il 50,5% e il 57,8%.

I dati rafforzano l'immagine di profili diversificati tra aree, con l'Amiata e Gela i più diversi, similitudini tra maschi e femmine nei campioni dell'Amiata e di Viterbo e differenze tra sessi a Gela e Taranto, dove tra i maschi l'As_i ha maggior peso ma le altre forme sono diversamente rappresentate, come emerso dal commento sull'efficienza differenziata di metilazione.

Indici di metilazione primaria, secondaria e totale

Come si evince dalla **tabella 15**, i rapporti di efficienza della metilazione presentano numerose differenze tra aree.

L'indice di metilazione primaria (MMA/As_i) mette in evidenza che:

- nel complesso dei campioni delle quattro aree l'MMA è inferiore del 18% rispetto all'As_i (7% nelle femmine e 21% nei maschi);
- nell'area dell'Amiata i valori di MMA sono superiori a quelli di As_i (35% nei maschi e 11% nelle femmine); a Viterbo i valori di MMA sono globalmente inferiori a quelli di As_i (15% nei maschi e 25% nelle femmine). Il dato di Viterbo di 0,85 tra i maschi è di poco inferiore a quello riportato da Cubadda et al., pari a 0,9;⁷⁷
- a Taranto i valori di MMA e di As_i si equivalgono per gli uomini, mentre MMA risulta inferiore del 25% rispetto ad As_i nelle femmine;
- a Gela i valori di MMA sono superiori a quelli di As_i nelle femmine (9%) mentre nei maschi risultano inferiori del 39%.

L'indice di metilazione secondaria (DMA/MMA) presenta valori di DMA superiori del 178% a quelli di MMA sul campione totale; il dato è molto simile tra maschi e femmine. In tutte le aree si notano valori di DMA superiori a quelli di MMA; si osservano in particolare aumenti che vanno dal 66% (Amiata maschi) fino al 205% (Viterbo femmine). Si noti che i valori di DMA nelle femmine dell'Amiata, di Viterbo e di Taranto sono superiori ri-

spetto a quelli degli uomini. Da notare che il dato di Viterbo è inferiore a quello riportato da Cubadda et. al., pari a 5,3.⁷⁷

L'indice di metilazione totale (DMA/As_i), considerando l'insieme delle quattro aree, presenta valori di DMA superiori a quelli As_i del 128%; il rapporto è più elevato tra i maschi rispetto alle femmine. I rapporti più alti si rilevano a Taranto, donne e uomini, mentre i più bassi si registrano a Gela, in particolare tra le donne, che presentano il valore più basso in assoluto. Le altre due aree sono in posizione intermedia, con valori più elevati nel Viterbo rispetto all'Amiata, e nei maschi rispetto alle femmine. In sintesi, l'analisi congiunta degli indici di efficienza di metilazione rivela una buona efficienza di metilazione primaria nel campione dell'Amiata, compensata da una peggiore efficienza secondaria, testimoniata dal valore più basso del rapporto DMA/MMA.

Un profilo opposto si osserva per gli uomini di Gela, caratterizzati da una elevata presenza di As_i, da una elevata efficienza secondaria, mentre l'efficienza totale risulta modesta. In contrasto, per le donne di Gela si osserva una buona efficienza primaria e una bassa efficienza secondaria e totale.

Il campione del Viterbo è invece caratterizzato da valori intermedi di efficienza primaria e valori medio-alti di efficienza secondaria e totale.

Rapporto tra As(III) e As(V)

L'As(III) è del 34% superiore rispetto all'As(V) sul totale dei campioni, con una modesta differenza tra maschi e femmine. In tutte le aree si osserva una concentrazione di As(III) maggiore rispetto ad As(V). Nelle femmine di Viterbo, di Taranto e di Gela si osservano rapporti di As(III)/As(V) più elevati rispetto a quelli dei maschi. I rapporti più elevati si osservano tra le femmine di Viterbo e di Gela e tra i maschi di Viterbo, mentre quelli più bassi si rilevano tra le femmine dell'Amiata (**tabella 16**).

In sintesi, l'As(III) prevale sull'As(V) nei campioni viterbesi e tra le femmine gelesi, confermando la diversità di *pattern* tra aree e tra maschi e femmine. I risultati supportano l'indicazione all'uso della somma dell'arsenico trivalente e pentavalente come indicatore più stabile di As_i.

Zona-sesso	MMA/As _i	DMA/MMA	DMA/As _i
Amiata-M	1,35	1,66	2,36
Amiata-F	1,11	2,21	2,05
Viterbo-M	0,85	2,92	2,61
Viterbo-F	0,75	3,20	2,46
Taranto-M	1,00	2,74	3,01
Taranto-F	0,75	3,02	3,27
Gela-M	0,61	3,05	1,99
Gela-F	1,09	1,99	1,59
totale M	0,79	2,77	2,31
totale F	0,93	2,81	2,16
totale	0,82	2,78	2,28

Sono stati esclusi i soggetti con MMA, DMA, As_i <LOD.
Subjects with MMA, DMA, iAs <LOD were not considered.

Tabella 15. Mediana dei valori degli indici di metilazione individuali.
Table 15. Median of the individual methylation index values.

Zona-sesso	As(III)/As(V)
Amiata-M	1,29
Amiata-F	1,10
Viterbo-M	1,40
Viterbo-F	1,60
Taranto-M	1,20
Taranto-F	1,35
Gela-M	1,27
Gela-F	1,49
totale M	1,31
totale F	1,38
totale	1,34

Sono stati esclusi i soggetti con As_i <LOD.
Subjects with iAs <LOD were not considered.

Tabella 16. Mediana dei valori del rapporto individuale tra As(III) e As(V).
Table 16. Median of the values of the individual ratio between As(III) and As(V).

Analisi di As_i e As_i+MMA+DMA per area, per sesso e per classi di età

Dalle analisi dell'arsenico inorganico in funzione della zona, del sesso e delle classi di età, non sono risultate interazioni statisticamente significative fra i tre fattori. L'età in particolare non influenza in maniera significativa sulla concentrazione dell'As_i.

Il modello che si adatta meglio ai dati è quello additivo, con i fattori «area» e «sesso» risultati significativi (senza considerare le interazioni tra fattori). Come si osserva dalle MG di As_i stimate at-

traverso il modello scelto e riportate in **tabella 17** e nel **grafico 5**, i maschi hanno concentrazioni di As_i significativamente superiori alle femmine in tutte le aree. Gela è la zona con maggiore concentrazione di As_i, seguita da Taranto, dal Viterbese e infine dall'area dell'Amiata, con valori di As_i più bassi. Sia per i maschi di Gela sia per quelli di Taranto si nota una MG prossima al valore di riferimento di 3,86 µg/l.

Una descrizione simile può essere fatta per la concentrazione di arsenico inorganico più le forme arsenicali metilate (MMA, DMA),

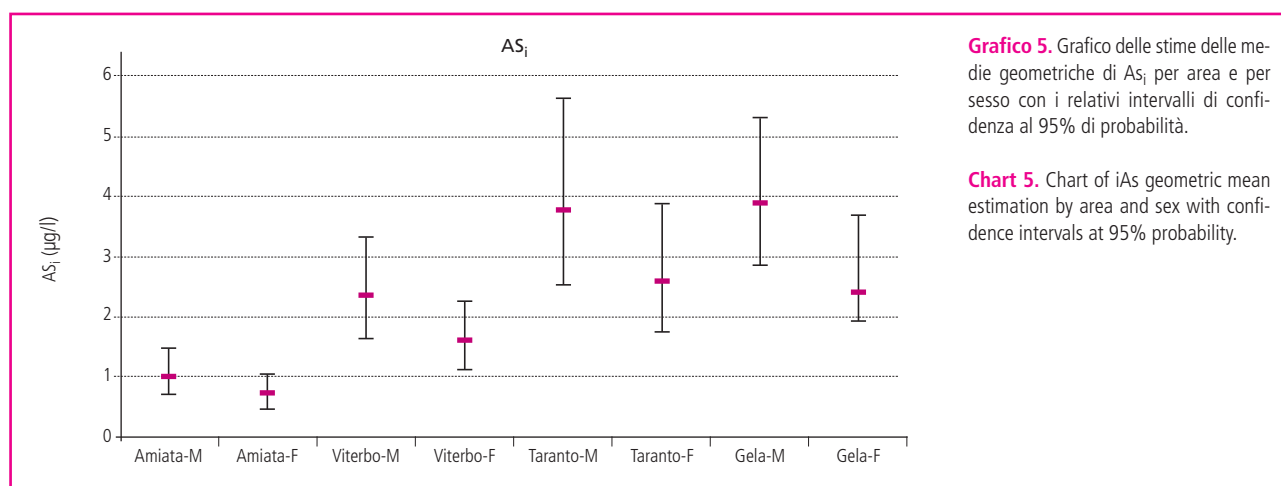


Grafico 5. Grafico delle stime delle medie geometriche di As_i per area e per sesso con i relativi intervalli di confidenza al 95% di probabilità.

Chart 5. Chart of iAs geometric mean estimation by area and sex with confidence intervals at 95% probability.

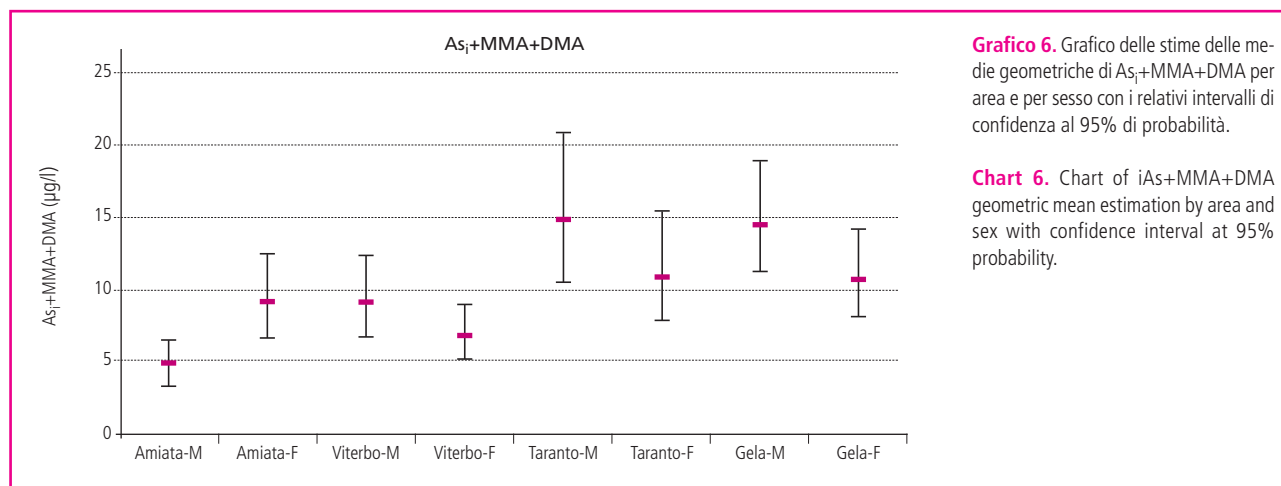


Grafico 6. Grafico delle stime delle medie geometriche di As_i+MMA+DMA per area e per sesso con i relativi intervalli di confidenza al 95% di probabilità.

Chart 6. Chart of iAs+MMA+DMA geometric mean estimation by area and sex with confidence interval at 95% probability.

Area-sesso	n	MG As _i	IC95%
Amiata-M	28	1,04	0,72-1,51
Amiata-F	30	0,72	0,5-1,05
Viterbo-M	32	2,36	1,66-3,35
Viterbo-F	40	1,64	1,18-2,29
Taranto-M	24	3,78	2,54-5,63
Taranto-F	26	2,63	1,77-3,9
Gela-M	48	3,91	2,87-5,31
Gela-F	43	2,72	1,98-3,73

Tabella 17. Stime delle medie geometriche di As_i per area e per sesso con i relativi intervalli di confidenza al 95% di probabilità.

Table 17. iAs geometric mean estimation by area and sex with confidence intervals at 95% probability.

Area-sesso	n	MG As _i +MMA+DMA	IC95%
Amiata-M	28	4,83	3,48-6,68
Amiata-F	30	9,14	6,75-12,39
Viterbo-M	32	9,14	6,75-12,39
Viterbo-F	40	6,76	5,06-9,04
Taranto-M	24	14,94	10,57-21,13
Taranto-F	26	11,05	7,85-15,56
Gela-M	48	14,63	11,19-19,11
Gela-F	43	10,82	8,22-14,24

Tabella 18. Stime delle medie geometriche di As_i+MMA+DMA per area e per sesso con i relativi intervalli di confidenza al 95% di probabilità.

Table 18. iAs+MMA+DMA geometric means estimation by area and sex with confidence intervals at 95% probability.

con l'unica differenza per la zona dell'Amiata, dove si nota una concentrazione di As_i +MMA+DMA più alta per le femmine (tabella 18 e grafico 6).

Avendo evidenziato differenze significative sia tra aree sia tra genere si è deciso di effettuare tutte le analisi successive per il totale del campione e separatamente per area e per sesso.

ANALISI ESPLORATIVA

Analisi preliminare su As_i con alberi decisionali

Lo sviluppo di modelli di classificazione con alberi decisionali è stato effettuato con lo scopo di identificare regole di associazione tra variabili responsabili di livelli elevati di As_i nelle urine.

Le tre classi, definite come descritto nel paragrafo Metodi esplorativi (pg 49), risultano sbilanciate verso la classe C, che raccoglie circa la metà del totale dei soggetti presi in esame. Nonostante questo *bias* di partenza, che tendenzialmente sconsiglierebbe l'uso dei classificatori come metodo elettivo per l'ottenimento di modelli con reale potere predittivo, si è comunque ritenuto interessante procedere in questo tipo di studio esplorativo preliminare, applicandolo al totale dei 267 soggetti, comprensivi di maschi (M) e femmine (F) delle quattro aree in studio. La tabella di contingenza, i valori di accuratezza e *TPrate*, e il grafico del miglior albero decisionale ottenuto in questa analisi, con la relativa descrizione, sono riportati nell'Allegato 20. Il modello di classificazione ha mostrato un'accuratezza superiore al 60% e un'ottima capacità predittiva per i soggetti di classe C (*TPrate*=0,81) e un discreto livello di classificazione per i soggetti con $As_i > 3,86 \mu\text{g/l}$.

Dall'analisi dell'albero decisionale risulta piuttosto evidente come la variabile identificativa dell'area geografica sia determinante nella classificazione: i soggetti dell'area dell'Amiata sono maggiormente caratterizzati da bassi livelli di As_i (classe C) rispetto alle altre tre aree. Una separazione analoga si osserva per l'area di Viterbo rispetto a quelle di Taranto e Gela, il che rispecchia i più bassi livelli di As_i (classi B e C in particolare) per la città laziale.

La variabile D6, relativa all'occupazione nell'industria chimica, caratterizza maggiormente la classe A (alti livelli di As_i). Da questa particolare analisi non è possibile capire quali delle tre aree (VT, TA e Gela) siano più interessate dalla variabile D6, ma è presumibile che essa caratterizzi soprattutto le aree interessate da inquinamento ambientale antropico.

Sono stati sviluppati modelli di classificazione per ciascuna area ma, vista la limitata numerosità dei soggetti e il notevole sbilanciamento tra le tre classi osservato in alcune aree, non sono stati ottenuti modelli caratterizzati da un livello di accuratezza tale da poter essere considerati sufficientemente informativi.

Le analisi differenziate per sesso sulla totalità delle quattro aree hanno invece confermato l'importanza della caratterizzazione per area geografica. In particolare, l'analisi sui soggetti maschi (riferiti al totale delle quattro aree) ha fornito ulteriori informazioni:

- i maschi di Gela sono caratterizzati da variabili di tipo occupazionale relative all'esposizione a derivati del petrolio (D1a.5) e a silice e lana di vetro (D1a.1) insieme a una variabile relativa al consumo abituale di verdure cotte;

- i maschi delle aree di Amiata, Viterbo e Taranto, con livelli più elevati di As_i (classe A), sono maggiormente caratterizzati dall'effetto concomitante delle variabili L (consumo di pesce e/o crostacei

nei tre giorni precedenti il prelievo) e C1.1 (soggetti lavoratori). In sintesi, l'analisi effettuata con alberi decisionali ha evidenziato una netta distinzione tra le quattro aree, come mostrato dalla variabile identificativa dell'area geografica che risulta determinante nella classificazione dei soggetti sin dai nodi superiori dell'albero decisionale sviluppato sul modello globale (n=267, M+F delle quattro aree). Dall'analisi emergono anche variabili di natura occupazionale (occupazione in aziende chimiche, esposizione a petrolio e a silice/lana di vetro), specialmente per le aree caratterizzate da inquinamento antropico, e variabili connesse alla dieta (consumo di pesce e di verdure).

Regressione multilineare

Lo studio preliminare con alberi decisionali è stato determinante per la definizione delle analisi di regressione multilineare effettuate per As_i e per As_i +MMA+DMA, secondo la lista riportata in tabella 19.

Sono stati sviluppati modelli per il campione di soggetti maschi+femmine (M+F) delle quattro aree prese nel loro insieme (TMF) e specifici per sesso (TM e TF). Inoltre sono state eseguite analisi esplorative per ciascuna area, sviluppando anche in questo caso modelli congiunti M+F e specifici per sesso.

Nell'Allegato 20 sono riportate le equazioni dei modelli ottenuti con una loro descrizione. Per ciascun modello sono segnalate in particolare alcune variabili, in accordo ai seguenti criteri:

- variabili che risultano significative e correlano positivamente nel modello con $\ln(As_i)$ (e con $\ln(As_i$ +MMA+DMA));
- variabili per le quali viene riportata una numerosità non inferiore al 10% del campione in esame in ciascuna analisi.

La tabella 20 riporta un confronto riepilogativo tra le variabili emerse dagli studi effettuati per As_i sulle quattro aree, relative ai modelli congiunti M+F. Una tabella più dettagliata, contenente variabili significative emerse anche nei modelli specifici per maschi e femmine, è riportata nell'Allegato 20.

In sintesi, dall'analisi esplorativa eseguita su As_i si osserva che le

ID analisi	Descrizione	n
T-MF	totale 4 aree, maschi+femmine	267
T-M	totale 4 aree, maschi	130
T-F	totale 4 aree, femmine	137
Am-MF	Amiata, maschi+femmine	58
Am-M	Amiata, maschi	28
Am-F	Amiata, femmine	30
VT-MF	Viterbo, maschi+femmine	72
VT-M	Viterbo, maschi	32
VT-F	Viterbo, femmine	40
TA-MF	Taranto, maschi+femmine	50
TA-M	Taranto, maschi	24
TA-F	Taranto, femmine	26
Ge-MF	Gela, maschi+femmine	87
Ge-M	Gela, maschi	46
Ge-F	Gela, femmine	41

Tabella 19. Codici identificativi dei modelli, loro descrizione e numerosità.

Table 19. Identification codes of the model, their descriptions and number of cases.

Tabella 20. Confronto tra le variabili emerse dagli studi effettuati per As_i sulle quattro aree, nei modelli congiunti M+F. Tutte le variabili mostrano un'associazione con As_i con $p < 0,20$.

Table 20. Comparison among the variables emerged from studies on iAs carried out in the four areas, in M+F models. All variables show an association with iAs with $p < 0,20$.

As_i	Amiata	Viterbo	Taranto	Gela
sezzo				F
polimorfismi	GST-T+		AS3MT	GST-T+
acqua	B11.3	B12.1		
pesce	L	L H1.o		
prodotti locali o prod. propria	H1.aP		H1.rP H1.a	
altri prodotti - dieta			D1a.2 D1a.4	D6
occupazione				
zona			RA1	Dist

Tabella 21. Confronto tra le variabili emerse dagli studi effettuati per As_i +MMA+DMA sulle quattro aree, nei modelli congiunti M+F. Tutte le variabili mostrano un'associazione con As_i con $p < 0,20$.

Table 21. Comparison among the variables emerged from studies on iAs +MMA+DMA carried out on the four areas, in the M+F models. All variables show an association with iAs with $p < 0,20$.

As_i +MMA+DMA	Amiata	Viterbo	Taranto	Gela
sezzo				F
polimorfismi				GST-T+
acqua	B11.3	B12.1	B12.1	
pesce	L	L		H1.o
prodotti locali o prod. propria	H1.aP		H1.rP H1.a	
altri prodotti - dieta		H1.r		
occupazione			C1.1 D1a.2 D1a.4	D6
zona			RA1	Dist

variabili occupazionali sono prerogativa delle aree di Taranto e Gela. Le variabili relative al consumo di pesce e alla tipologia di acqua usata per bere o cucinare sono informative delle aree di Amiata e Viterbo. In particolare, il consumo di acqua in bottiglia risulta maggiormente associato nell'Amiata e correlato negativamente con As_i ; così come l'utilizzo di acqua di acquedotto pubblico per cucinare risulta statisticamente significativo a Viterbo (M+F). Il consumo di pesce nei tre giorni precedenti il prelievo, una delle variabili più significative nel modello congiunto M+F sviluppato sul totale delle quattro aree, non è presente nei modelli M+F sviluppati per le aree interessate da inquinamento antropico, se non nel modello sviluppato per le femmine dell'area Gela. E' possibile che il consumo di pesce, seppure significativo per As_i , sia coperto in queste aree da variabili di tipo occupazionale (per esempio, esposizione ad asbesto, a metalli e occupazione in industrie chimiche) o legate alla zona. Per l'area di Gela, le variabili connesse alla dieta sono incluse solo nei modelli specifici per maschi e femmine, ma non risultano nel modello congiunto M+F. La **tabella 21** riporta un confronto riepilogativo tra le variabili emerse dagli studi effettuati per As_i +MMA+DMA sulle quattro aree, nei modelli congiunti M+F. Una tabella più dettagliata,

contenente variabili significative emerse anche nei modelli specifici per maschi e femmine, è riportata nell'Allegato 20.

In sintesi, i risultati ottenuti dall'analisi esplorativa su As_i +MMA+DMA sono sovrapponibili a quelli ottenuti dall'analisi su As_i . Le variabili di tipo occupazionale sono prerogativa di Taranto e Gela. Tuttavia, le variabili connesse ad acqua e pesce, nel caso dei modelli sviluppati per As_i +MMA+DMA, non sono esclusive di Amiata e Viterbo: per il modello congiunto M+F relativo a Taranto (amdTA_MF), risulta significativa la variabile B12.1 connessa all'utilizzo di acqua di acquedotto per cucinare; per il modello congiunto M+F relativo a Gela (amdGeMF), risulta significativa la variabile H1.o, connessa al consumo di pesce.

Analisi descrittive univariate relative a variabili del questionario e a marcatori genetici

In seguito alle analisi esplorative sono state eseguite analisi descrittive univariate relative a variabili del questionario e a marcatori genetici. Di seguito sono riportati i commenti ai risultati delle analisi univariate effettuate sulle variabili del questionario, selezionate dall'analisi esplorativa e che risultano di maggiore interesse, o per le quali in letteratura è riportata una correlazione

con l'esposizione ad arsenico inorganico. Sono stati riportati, inoltre, solo i commenti relativi alle variabili che presentano variazioni di MG statisticamente significative ($p < 0,05$) o ai limiti della significatività ($p < 0,10$) e con un numero di casi maggiore o uguale a 3. Le analisi univariate sono riportate nella loro completezza nell'Allegato 21.

Acqua e arsenico

Per quanto riguarda coloro che bevono acqua dell'acquedotto pubblico (esposti), tra le femmine dell'Amiata si osserva un aumento ai limiti della significatività statistica della MG di As_i ma i valori delle MG dell'Amiata sono i più bassi di tutte le aree e sono sempre inferiori al cut-off di 1,5 $\mu\text{g/l}$ ($n_{\text{esp}}=16$, $MG_{\text{esp}}=1,05$, $n_{\text{nonesp}}=14$, $MG_{\text{nonesp}}=0,49$; $p=0,053$). Un aumento, anche se non statisticamente significativo, si osserva tra i maschi esposti di Gela, caratterizzati da una MG di As_i fino a 7,32 $\mu\text{g/l}$ ($n_{\text{esp}}=5$, $MG_{\text{esp}}=7,32$, $n_{\text{nonesp}}=42$, $MG_{\text{nonesp}}=4,17$).

Nel caso di As_i +MMA+DMA in tutte le aree e per entrambi i generi si osserva una diminuzione statisticamente significativa della MG ($n_{\text{esp}}=65$, $MG_{\text{esp}}=6,56$, $n_{\text{nonesp}}=204$, $MG_{\text{nonesp}}=9,53$; $p=0,032$) in particolare tra i maschi ($n_{\text{esp}}=35$, $MG_{\text{esp}}=6,99$, $n_{\text{nonesp}}=96$, $MG_{\text{nonesp}}=11,92$; $p=0,023$). Si noti che le MG di tutte le aree sono inferiori al cut-off di 15 $\mu\text{g/l}$.

Tra coloro che bevono acqua imbottigliata si osserva una diminuzione statisticamente significativa delle MG di As_i tra le femmine dell'Amiata con valori inferiori al cut-off ($n_{\text{esp}}=18$, $MG_{\text{esp}}=0,45$, $n_{\text{nonesp}}=12$, $MG_{\text{nonesp}}=1,54$; $p=0,001$) e una diminuzione ai limiti della significatività tra le femmine di Viterbo con valori superiori al cut-off di 1,5 $\mu\text{g/l}$ ($n_{\text{esp}}=36$, $MG_{\text{esp}}=1,53$, $n_{\text{nonesp}}=4$, $MG_{\text{nonesp}}=4,27$; $p=0,081$).

Per quanto riguarda As_i +MMA+DMA, si conferma la diminuzione statisticamente significativa della MG in Amiata ($n_{\text{esp}}=32$, $MG_{\text{esp}}=3,15$, $n_{\text{nonesp}}=26$, $MG_{\text{nonesp}}=5,77$; $p=0,025$), in particolare tra le femmine ($n_{\text{esp}}=18$, $MG_{\text{esp}}=2,36$, $n_{\text{nonesp}}=12$, $MG_{\text{nonesp}}=7,08$; $p=0,001$) e a Viterbo ($n_{\text{esp}}=66$, $MG_{\text{esp}}=7,13$, $n_{\text{nonesp}}=6$, $MG_{\text{nonesp}}=18,86$; $p=0,011$), in particolare tra le femmine ($n_{\text{esp}}=36$, $MG_{\text{esp}}=6,37$, $n_{\text{nonesp}}=4$, $MG_{\text{nonesp}}=14,44$; $p=0,090$).

Tra coloro che cucinano con acqua dell'acquedotto pubblico, a Viterbo si osserva un aumento statisticamente significativo della MG di As_i rispetto a coloro che non la utilizzano ($n_{\text{esp}}=38$, $MG_{\text{esp}}=2,60$, $n_{\text{nonesp}}=34$, $MG_{\text{nonesp}}=1,38$; $p=0,015$).

Per quanto riguarda As_i +MMA+DMA, viene confermato il risultato di Viterbo ($n_{\text{esp}}=38$, $MG_{\text{esp}}=9,59$, $n_{\text{nonesp}}=34$, $MG_{\text{nonesp}}=6,08$; $p=0,033$) e si aggiunge la significatività statistica tra i maschi di Taranto ($n_{\text{esp}}=21$, $MG_{\text{esp}}=15,42$, $n_{\text{nonesp}}=3$, $MG_{\text{nonesp}}=3,64$; $p=0,043$).

Lavoro e arsenico

In tutte le aree e in entrambi i generi, per coloro con esposizione occupazionale a polveri, sostanze chimiche, gas o radiazioni, si osservano:

- un aumento statisticamente significativo della MG di As_i rispetto ai non esposti ($n_{\text{esp}}=114$, $MG_{\text{esp}}=2,66$, $n_{\text{nonesp}}=155$, $MG_{\text{nonesp}}=1,77$; $p=0,026$); tale significatività statistica è spiegata da Taranto e Gela, dove si evidenziano differenze non statisticamente significative (per Taranto $n_{\text{esp}}=22$, $MG_{\text{esp}}=4,73$, $n_{\text{nonesp}}=28$, $MG_{\text{nonesp}}=2,28$; per Gela

$n_{\text{esp}}=51$, $MG_{\text{esp}}=4,00$, $n_{\text{nonesp}}=38$, $MG_{\text{nonesp}}=2,60$); si noti che per Taranto e Gela i valori di MG negli esposti sono superiori al cut-off di 1,5 $\mu\text{g/l}$;

- un aumento statisticamente significativo della MG di As_i +MMA+DMA rispetto ai non esposti ($n_{\text{esp}}=114$, $MG_{\text{esp}}=10,34$, $n_{\text{nonesp}}=155$, $MG_{\text{nonesp}}=7,50$; $p=0,043$); a tale significatività statistica contribuisce maggiormente il dato di Taranto ($n_{\text{esp}}=22$, $MG_{\text{esp}}=17,56$, $n_{\text{nonesp}}=28$, $MG_{\text{nonesp}}=9,84$; $p=0,088$).

Per quanto riguarda le specifiche di tale esposizione lavorativa si osserva che:

- tra gli esposti sia alla silice/lana di vetro sia ad asbesto/amianto, i maschi di Taranto presentano un aumento della MG di As_i ai limiti della significatività statistica (rispettivamente $n_{\text{esp}}=8$, $MG_{\text{esp}}=6,83$, $n_{\text{nonesp}}=16$, $MG_{\text{nonesp}}=2,32$, $p=0,094$ e $n_{\text{esp}}=6$, $MG_{\text{esp}}=9,20$, $n_{\text{nonesp}}=18$, $MG_{\text{nonesp}}=2,37$, $p=0,051$). Si noti che i maschi non esposti presentano MG di As_i superiori al cut-off di riferimento e gli esposti presentano una MG superiore di 4,5 volte il valore del cut-off per esposizione a silice/lana di vetro e di 6 volte per esposizione ad asbesto/amianto.

Si osserva un aumento statisticamente significativo della MG di As_i +MMA+DMA tra i maschi di tutte le aree esposti a silice/lana di vetro e ad asbesto/amianto (silice/lana di vetro $n_{\text{esp}}=33$, $MG_{\text{esp}}=15,17$, $n_{\text{nonesp}}=98$, $MG_{\text{nonesp}}=9,08$, $p=0,033$; asbesto/amianto $n_{\text{esp}}=31$, $MG_{\text{esp}}=15,47$, $n_{\text{nonesp}}=100$, $MG_{\text{nonesp}}=9,12$, $p=0,031$). A tale significatività statistica contribuisce in maggior misura il dato di Taranto (silice/lana di vetro $n_{\text{esp}}=8$, $MG_{\text{esp}}=24,13$, $n_{\text{nonesp}}=16$, $MG_{\text{nonesp}}=9,40$, $p=0,062$; asbesto/amianto $n_{\text{esp}}=6$, $MG_{\text{esp}}=28,01$, $n_{\text{nonesp}}=18$, $MG_{\text{nonesp}}=9,94$, $p=0,059$).

- tra gli esposti a polveri di metallo si osserva una situazione analoga a quella riportata precedentemente per Taranto, anche se non viene raggiunta la significatività statistica ($n_{\text{esp}}=8$, $MG_{\text{esp}}=4,97$, $n_{\text{nonesp}}=16$, $MG_{\text{nonesp}}=2,72$).

Questa osservazione vale anche per As_i +MMA+DMA ($n_{\text{esp}}=8$, $MG_{\text{esp}}=19,34$, $n_{\text{nonesp}}=16$, $MG_{\text{nonesp}}=10,51$);

- tra gli esposti a derivati del petrolio tra i maschi di Gela si osserva un aumento della MG di As_i ai limiti della significatività statistica ($n_{\text{esp}}=23$, $MG_{\text{esp}}=6,05$, $n_{\text{nonesp}}=24$, $MG_{\text{nonesp}}=3,28$; $p=0,077$); si noti che i maschi non esposti presentano MG di As_i superiori al cut-off di riferimento e gli esposti presentano una MG di As_i superiore di 4,5 volte il valore del cut-off.

Per As_i +MMA+DMA si osserva un aumento statisticamente significativo della MG tra i maschi di Gela ($n_{\text{esp}}=23$, $MG_{\text{esp}}=24,00$, $n_{\text{nonesp}}=24$, $MG_{\text{nonesp}}=11,32$; $p=0,032$);

- tra gli esposti a solventi organici, tinture e acidi in tutte le aree, la significatività statistica osservata per As_i ($n_{\text{esp}}=51$, $MG_{\text{esp}}=3,87$, $n_{\text{nonesp}}=218$, $MG_{\text{nonesp}}=1,83$; $p=0,001$) è data da Taranto e da Gela che, pur non presentando valori statisticamente significativi, presentano negli esposti MG di As_i superiori al cut-off (Taranto $n_{\text{esp}}=14$, $MG_{\text{esp}}=4,96$, $n_{\text{nonesp}}=36$, $MG_{\text{nonesp}}=2,62$; Gela $n_{\text{esp}}=28$, $MG_{\text{esp}}=3,91$, $n_{\text{nonesp}}=61$, $MG_{\text{nonesp}}=3,00$).

La significatività statistica osservata per As_i +MMA+DMA ($n_{\text{esp}}=51$, $MG_{\text{esp}}=14,19$, $n_{\text{nonesp}}=218$, $MG_{\text{nonesp}}=7,77$; $p=0,001$) è data da Taranto e da Gela che, pur non presentando valori statisticamente significativi, presentano negli esposti MG di As_i superiori al cut-off (Taranto $n_{\text{esp}}=14$, $MG_{\text{esp}}=16,96$, $n_{\text{nonesp}}=36$, $MG_{\text{nonesp}}=11,22$; Gela $n_{\text{esp}}=28$, $MG_{\text{esp}}=19,19$, $n_{\text{nonesp}}=61$, $MG_{\text{nonesp}}=14,67$);

■ tra gli esposti a **polveri di legno e carbone**, la significatività statistica complessiva in tutte le aree ($n_{\text{esp}}=40$, $MG_{\text{esp}}=3,60$, $n_{\text{nonesp}}=229$, $MG_{\text{nonesp}}=1,92$; $p=0,009$) è maggiormente influenzata dal risultato ai limiti della significatività statistica di Gela ($n_{\text{esp}}=25$, $MG_{\text{esp}}=5,01$, $n_{\text{nonesp}}=64$, $MG_{\text{nonesp}}=2,76$; $p=0,076$), e da Taranto ($n_{\text{esp}}=7$, $MG_{\text{esp}}=4,60$, $n_{\text{nonesp}}=43$, $MG_{\text{nonesp}}=2,94$) anche se non statisticamente significativo. Anche in questo caso gli esposti delle due aree sono caratterizzati da valori di MG superiori al cut-off di 1,5 µg/l. Per As_i +MMA+DMA viene confermata la situazione osservata per As_i ; la significatività statistica complessiva in tutte le aree ($n_{\text{esp}}=40$, $MG_{\text{esp}}=14,17$, $n_{\text{nonesp}}=229$, $MG_{\text{nonesp}}=8,00$; $p=0,006$) è data da Taranto ($n_{\text{esp}}=7$, $MG_{\text{esp}}=16,86$, $n_{\text{nonesp}}=43$, $MG_{\text{nonesp}}=12,21$) e da Gela, anche se è solo Gela a presentare un risultato ai limiti della significatività statistica ($n_{\text{esp}}=25$, $MG_{\text{esp}}=18,36$, $n_{\text{nonesp}}=64$, $MG_{\text{nonesp}}=10,83$; $p=0,100$). Anche in questo caso gli esposti di Taranto e Gela sono caratterizzati dai valori di MG superiori al cut-off di 15 µg/l.

■ nei maschi di tutte le aree che hanno lavorato in un'industria di prodotti chimici si osserva un aumento statisticamente significativo della MG rispetto ai non esposti ($n_{\text{esp}}=21$, $MG_{\text{esp}}=7,25$, $n_{\text{nonesp}}=110$, $MG_{\text{nonesp}}=2,14$; $p < 0,001$). Tale significatività statistica è spiegata dai maschi di Gela ($n_{\text{esp}}=17$, $MG_{\text{esp}}=8,48$, $n_{\text{nonesp}}=30$, $MG_{\text{nonesp}}=3,06$; $p=0,004$), caratterizzati da MG di As_i tra gli esposti superiori al cut-off di 1,5 µg/l.

Per As_i +MMA+DMA si conferma quanto osservato per As_i ; nei maschi di tutte le aree si rileva un aumento statisticamente significativo della MG rispetto ai non esposti ($n_{\text{esp}}=21$, $MG_{\text{esp}}=31,35$, $n_{\text{nonesp}}=110$, $MG_{\text{nonesp}}=8,36$; $p < 0,001$). Tale significatività statistica è spiegata dai maschi di Gela ($n_{\text{esp}}=17$, $MG_{\text{esp}}=36,08$, $n_{\text{nonesp}}=30$, $MG_{\text{nonesp}}=10,44$; $p < 0,001$), caratterizzati da MG di As_i +MMA+DMA tra gli esposti superiori al cut-off di 1,5 µg/l.

Dieta e arsenico

Tra coloro che consumano pesce si osserva un aumento statisticamente significativo delle MG di As_i in entrambi i generi di tutte le aree ($n_{\text{esp}}=205$, $MG_{\text{esp}}=2,33$, $n_{\text{nonesp}}=64$, $MG_{\text{nonesp}}=1,47$; $p=0,022$) e in particolare tra i maschi ($n_{\text{esp}}=103$, $MG_{\text{esp}}=3,00$, $n_{\text{nonesp}}=28$, $MG_{\text{nonesp}}=1,56$; $p=0,022$). Tale significatività statistica è data in particolare dai maschi di Viterbo ($n_{\text{esp}}=26$, $MG_{\text{esp}}=2,67$, $n_{\text{nonesp}}=6$, $MG_{\text{nonesp}}=1,12$; $p=0,081$) e di Gela ($n_{\text{esp}}=33$, $MG_{\text{esp}}=6,03$, $n_{\text{nonesp}}=14$, $MG_{\text{nonesp}}=2,13$; $p=0,005$). Tra i non esposti, a Viterbo la MG è sempre inferiore al cut-off mentre a Gela è sempre superiore.

Nel caso di As_i +MMA+DMA si osserva un aumento della MG per entrambi i generi di tutte le aree ($n_{\text{esp}}=205$, $MG_{\text{esp}}=9,48$, $n_{\text{nonesp}}=64$, $MG_{\text{nonesp}}=6,37$; $p=0,023$), in particolare tra i maschi ($n_{\text{esp}}=103$, $MG_{\text{esp}}=11,72$, $n_{\text{nonesp}}=28$, $MG_{\text{nonesp}}=6,50$; $p=0,020$), in entrambi i generi di Viterbo ($n_{\text{esp}}=55$, $MG_{\text{esp}}=8,64$, $n_{\text{nonesp}}=17$, $MG_{\text{nonesp}}=5,41$; $p=0,063$) e in entrambi i generi di Gela ($n_{\text{esp}}=61$, $MG_{\text{esp}}=15,56$, $n_{\text{nonesp}}=28$, $MG_{\text{nonesp}}=7,21$; $p=0,013$), in particolare tra i maschi ($n_{\text{esp}}=33$, $MG_{\text{esp}}=23,57$, $n_{\text{nonesp}}=14$, $MG_{\text{nonesp}}=6,91$; $p=0,001$). I valori delle MG in tutte le aree e a Viterbo sono inferiori al cut-off di 15 µg/l mentre a Gela solo gli esposti presentano una MG superiore al cut-off.

Se si considera il consumo di pesce di produzione propria/locale si osserva un aumento statisticamente significativo della MG di As_i

in entrambi i generi di tutte le aree ($n_{\text{esp}}=55$, $MG_{\text{esp}}=3,07$, $n_{\text{nonesp}}=214$, $MG_{\text{nonesp}}=1,92$; $p=0,027$) e in particolare tra i maschi ($n_{\text{esp}}=30$, $MG_{\text{esp}}=3,73$, $n_{\text{nonesp}}=101$, $MG_{\text{nonesp}}=2,34$; $p=0,094$). Tale significatività statistica è data da Taranto ($n_{\text{esp}}=40$, $MG_{\text{esp}}=3,86$, $n_{\text{nonesp}}=10$, $MG_{\text{nonesp}}=1,35$; $p=0,055$), in particolare dai maschi ($n_{\text{esp}}=17$, $MG_{\text{esp}}=3,70$, $n_{\text{nonesp}}=9$, $MG_{\text{nonesp}}=0,28$; $p=0,091$). Si fa notare che tra i maschi di Gela gli esposti hanno una MG superiore ai non esposti anche se la differenza non è statisticamente significativa ($n_{\text{esp}}=4$, $MG_{\text{esp}}=7,20$, $n_{\text{nonesp}}=43$, $MG_{\text{nonesp}}=4,23$); è inoltre da evidenziare che tale MG è la più elevata rispetto a tutte le aree.

Per As_i +MMA+DMA si conferma quanto osservato per As_i ; si rileva un aumento statisticamente significativo della MG in entrambi i generi di tutte le aree ($n_{\text{esp}}=55$, $MG_{\text{esp}}=12,44$, $n_{\text{nonesp}}=214$, $MG_{\text{nonesp}}=7,94$; $p=0,015$) e in particolare tra i maschi ($n_{\text{esp}}=30$, $MG_{\text{esp}}=14,63$, $n_{\text{nonesp}}=101$, $MG_{\text{nonesp}}=9,32$; $p=0,069$). Tale significatività statistica è data da Taranto ($n_{\text{esp}}=40$, $MG_{\text{esp}}=15,49$; $n_{\text{nonesp}}=10$, $MG_{\text{nonesp}}=5,91$; $p=0,018$), in particolare dai maschi ($n_{\text{esp}}=17$, $MG_{\text{esp}}=14,75$, $n_{\text{nonesp}}=9$, $MG_{\text{nonesp}}=0,57$; $p=0,004$). Si fa notare che tra i maschi di Gela gli esposti hanno una MG superiore ai non esposti anche se la differenza non è statisticamente significativa ($n_{\text{esp}}=4$, $MG_{\text{esp}}=23,40$, $n_{\text{nonesp}}=43$, $MG_{\text{nonesp}}=15,82$) e inoltre è da evidenziare che tale MG è la più elevata rispetto a tutte le aree.

Per il consumo di verdure fresche non si osserva nessuna significatività statistica mentre la si rileva tra le femmine di tutte le aree che consumano verdure fresche di produzione propria/locale ($n_{\text{esp}}=37$, $MG_{\text{esp}}=2,71$, $n_{\text{nonesp}}=101$, $MG_{\text{nonesp}}=1,47$; $p=0,027$), in particolare per le femmine di Viterbo, anche se ai limiti della significatività statistica ($n_{\text{esp}}=4$, $MG_{\text{esp}}=4,39$, $n_{\text{nonesp}}=36$, $MG_{\text{nonesp}}=1,52$; $p=0,072$). Si notano differenze non statisticamente significative tra le femmine di Taranto ($n_{\text{esp}}=18$, $MG_{\text{esp}}=3,93$, $n_{\text{nonesp}}=8$, $MG_{\text{nonesp}}=1,56$) e Gela ($n_{\text{esp}}=7$, $MG_{\text{esp}}=3,55$, $n_{\text{nonesp}}=35$, $MG_{\text{nonesp}}=2,13$).

Nel caso di As_i +MMA+DMA si osserva un aumento ai limiti della significatività statistica della MG per il consumo di verdure fresche per entrambi i generi di Viterbo ($n_{\text{esp}}=69$, $MG_{\text{esp}}=8,04$, $n_{\text{nonesp}}=3$, $MG_{\text{nonesp}}=3,13$; $p=0,079$). Per il consumo di verdure fresche di produzione propria/locale si osserva un aumento statisticamente significativo della MG tra le femmine di tutte le aree ($n_{\text{esp}}=37$, $MG_{\text{esp}}=10,76$, $n_{\text{nonesp}}=101$, $MG_{\text{nonesp}}=6,45$; $p=0,030$), in particolare tra quelle di Viterbo ($n_{\text{esp}}=4$, $MG_{\text{esp}}=6,34$, $n_{\text{nonesp}}=36$, $MG_{\text{nonesp}}=15,06$; $p=0,072$) e in entrambi i generi di Taranto ($n_{\text{esp}}=38$, $MG_{\text{esp}}=7,53$, $n_{\text{nonesp}}=12$, $MG_{\text{nonesp}}=15,09$; $p=0,072$) anche se ai limiti della significatività statistica.

Tra coloro che consumano frutta si osserva una diminuzione ai limiti della significatività statistica delle MG di As_i tra le femmine di tutte le aree ($n_{\text{esp}}=124$, $MG_{\text{esp}}=1,61$, $n_{\text{nonesp}}=14$, $MG_{\text{nonesp}}=3,25$; $p=0,086$), significatività spiegata principalmente da Taranto ($n_{\text{esp}}=46$, $MG_{\text{esp}}=2,79$, $n_{\text{nonesp}}=4$, $MG_{\text{nonesp}}=11,80$; $p=0,075$).

Per As_i +MMA+DMA si osserva una diminuzione ai limiti della significatività statistica della MG tra le femmine di tutte le aree ($n_{\text{esp}}=124$, $MG_{\text{esp}}=6,76$, $n_{\text{nonesp}}=14$, $MG_{\text{nonesp}}=12,75$; $p=0,081$). Si noti che tra coloro che consumano frutta di produzione propria/locale per As_i non si osserva alcuna significatività statistica mentre per As_i +MMA+DMA si osserva un aumento statisticamente significativo della MG per entrambi i generi di tutte le aree

($n_{\text{esp}}=85$, $MG_{\text{esp}}=11,39$, $n_{\text{nonesp}}=184$, $MG_{\text{nonesp}}=8,01$; $p=0,044$) e in particolare tra i maschi ($n_{\text{esp}}=49$, $MG_{\text{esp}}=14,03$, $n_{\text{nonesp}}=82$, $MG_{\text{nonesp}}=9,20$; $p=0,072$). Tale significatività statistica non è spiegata da nessuna area in particolare, ma il contributo maggiore è dato dai maschi di Taranto ($n_{\text{esp}}=18$, $MG_{\text{esp}}=14,44$, $n_{\text{nonesp}}=6$, $MG_{\text{nonesp}}=5,77$) e Gela ($n_{\text{esp}}=20$, $MG_{\text{esp}}=30,24$, $n_{\text{nonesp}}=27$, $MG_{\text{nonesp}}=14,95$). Si noti che, fatta eccezione per gli esposti di sesso maschile di Gela, le MG sia dei non esposti sia degli esposti sono sempre minori del cut-off.

Per il consumo di pasta e pane di produzione propria/locale si osserva un aumento ai limiti della significatività statistica della MG di As_i tra i maschi di Taranto ($n_{\text{esp}}=6$, $MG_{\text{esp}}=8,32$, $n_{\text{nonesp}}=18$, $MG_{\text{nonesp}}=2,45$; $p=0,081$). Si noti che i non esposti presentano una MG superiore al cut-off e gli esposti sono caratterizzati da una MG cinque volte superiore al cut-off.

Nel caso di As_i +MMA+DMA la situazione cambia: si osserva un aumento ai limiti della significatività statistica della MG tra i maschi di tutte le aree ($n_{\text{esp}}=12$, $MG_{\text{esp}}=18,47$, $n_{\text{nonesp}}=119$, $MG_{\text{nonesp}}=9,75$; $p=0,077$). In questo caso l'aumento è dato dai maschi dell'Amiata, la cui MG rimane sempre al di sotto del cut-off ($n_{\text{esp}}=5$, $MG_{\text{esp}}=10,41$, $n_{\text{nonesp}}=23$, $MG_{\text{nonesp}}=3,95$; $p=0,072$). Se si considera il consumo di pesci/molluschi nei tre giorni precedenti il prelievo si osserva un aumento statisticamente significativo della MG di As_i in entrambi i generi di tutte le aree ($n_{\text{esp}}=63$, $MG_{\text{esp}}=3,62$, $n_{\text{nonesp}}=198$, $MG_{\text{nonesp}}=1,81$; $p=0,001$) e in particolare tra le femmine ($n_{\text{esp}}=33$, $MG_{\text{esp}}=3,81$, $n_{\text{nonesp}}=100$, $MG_{\text{nonesp}}=1,35$; $p < 0,001$). Dai risultati per area si osserva un aumento statisticamente significativo della MG di As_i tra le femmine dell'Amiata ($n_{\text{esp}}=10$, $MG_{\text{esp}}=1,54$, $n_{\text{nonesp}}=18$, $MG_{\text{nonesp}}=0,45$; $p=0,003$), tra i maschi di Viterbo ($n_{\text{esp}}=12$, $MG_{\text{esp}}=6,61$, $n_{\text{nonesp}}=20$, $MG_{\text{nonesp}}=1,20$; $p < 0,001$), tra le femmine di Viterbo ($n_{\text{esp}}=8$, $MG_{\text{esp}}=5,62$, $n_{\text{nonesp}}=29$, $MG_{\text{nonesp}}=1,27$; $p=0,001$) e tra le femmine di Gela ($n_{\text{esp}}=11$, $MG_{\text{esp}}=5,89$, $n_{\text{nonesp}}=31$, $MG_{\text{nonesp}}=1,66$; $p=0,023$). Tra le femmine di Taranto, invece, si osserva un aumento della MG di As_i non statisticamente significativo ($n_{\text{esp}}=4$, $MG_{\text{esp}}=5,10$, $n_{\text{nonesp}}=22$, $MG_{\text{nonesp}}=2,68$).

Per As_i +MMA+DMA si osserva un aumento statisticamente significativo della MG in entrambi i generi di tutte le aree ($n_{\text{esp}}=63$, $MG_{\text{esp}}=13,57$, $n_{\text{nonesp}}=198$, $MG_{\text{nonesp}}=7,66$; $p=0,001$), in particolare tra le femmine ($n_{\text{esp}}=33$, $MG_{\text{esp}}=14,18$, $n_{\text{nonesp}}=100$, $MG_{\text{nonesp}}=6,02$; $p=0,001$). Dai risultati per area si osserva un aumento statisticamente significativo della MG in Amiata ($n_{\text{esp}}=14$, $MG_{\text{esp}}=7,10$, $n_{\text{nonesp}}=41$, $MG_{\text{nonesp}}=3,29$; $p=0,015$), in particolare tra le femmine ($n_{\text{esp}}=10$, $MG_{\text{esp}}=6,53$, $n_{\text{nonesp}}=18$, $MG_{\text{nonesp}}=2,36$; $p=0,005$), a Viterbo ($n_{\text{esp}}=20$, $MG_{\text{esp}}=18,51$, $n_{\text{nonesp}}=49$, $MG_{\text{nonesp}}=5,61$; $p < 0,001$) sia tra i maschi ($n_{\text{esp}}=12$, $MG_{\text{esp}}=19,35$, $n_{\text{nonesp}}=20$, $MG_{\text{nonesp}}=5,59$; $p < 0,001$) sia tra le femmine ($n_{\text{esp}}=8$, $MG_{\text{esp}}=17,30$, $n_{\text{nonesp}}=29$, $MG_{\text{nonesp}}=5,63$; $p=0,002$) e per le femmine di Gela ($n_{\text{esp}}=11$, $MG_{\text{esp}}=23,06$, $n_{\text{nonesp}}=31$, $MG_{\text{nonesp}}=6,78$; $p=0,015$).

Genetica e arsenico

Nel caso del polimorfismo GST-T si osserva un aumento statisticamente significativo della MG di As_i in entrambi i generi di tutte le aree e in particolare tra le femmine. Tale significatività statistica è spiegata dalle femmine di Gela per le quali la MG tra le esposte raggiunge

un valore quasi 17 volte il cut-off. Si osservi che, tranne l'Amiata, i valori della MG di esposti e non esposti è superiore al cut-off.

Anche per polimorfismo GST-T e As_i +MMA+DMA gli andamenti delle MG non cambiano rispetto al caso di As_i , ma le MG dei non esposti e degli esposti non superano il cut-off, tranne che nel caso di Gela, dove gli esposti hanno MG superiori al cut-off.

Considerazioni conclusive

In sintesi, per quanto riguarda acqua e arsenico, in Amiata chi beve acqua dell'acquedotto pubblico presenta un aumento della MG di As_i mentre chi beve acqua imbottigliata mostra una diminuzione della MG di As_i ma i valori sono sempre inferiori al cut-off di 1,5 $\mu\text{g/l}$. A Viterbo chi beve acqua e chi cucina con acqua dell'acquedotto pubblico presenta un aumento della MG, anche se non statisticamente significativo, mentre in chi beve acqua imbottigliata si nota una diminuzione statisticamente significativa della MG di As_i e i valori delle MG degli esposti e dei non esposti sono superiori al cut-off. Taranto e Gela non raggiungono mai la significatività statistica, ma le MG degli esposti superano il cut-off nella maggior parte dei casi.

Nel caso dell'esposizione occupazionale a polveri, sostanze chimiche, gas o radiazioni, si osservano significatività statistiche solo tra i maschi di Taranto e Gela. A Taranto si registrano aumenti statisticamente significativi delle MG di As_i e As_i +MMA+DMA per esposizioni a silice/lanana di vetro e ad asbesto/amianto, e aumenti non statisticamente significativi per esposizioni a polveri di metallo e solventi organici/tinture/acidi e polveri di legno/carbone. A Gela si osservano aumenti statisticamente significativi delle MG di As_i e di As_i +MMA+DMA per esposizioni a derivati del petrolio e a polveri di legno/carbone e aumenti non statisticamente significativi per esposizioni a solventi organici/tinture/acidi. In queste due aree si osserva che le MG di As_i tra i non esposti sono sempre superiori al cut-off e quelle degli esposti raggiungono valori fino a 4,5 volte il cut-off. Per As_i +MMA+DMA, invece, i non esposti presentano anche valori inferiori al cut-off mentre tutti gli esposti mostrano valori superiori.

I maschi di Gela presentano aumenti statisticamente significativi della MG di As_i e di As_i +MMA+DMA anche nel caso di esperienza lavorativa in industrie di prodotti chimici. I non esposti sia di Gela sia di Taranto presentano valori di MG superiori ai cut-off.

Per quanto riguarda il rapporto tra dieta e arsenico, si osservano aumenti statisticamente significativi delle MG di As_i tra i maschi di Viterbo e di Gela con valori superiori al cut-off sia tra i non esposti sia tra gli esposti per il consumo di pesce. La situazione cambia se si considera il consumo di pesce di produzione propria/locale: in questo caso sono i maschi di Taranto a presentare aumenti delle MG di As_i statisticamente significativi e con valori superiori al cut-off sia tra i non esposti sia tra gli esposti. La stessa condizione è presente anche tra i maschi di Gela, senza differenze statisticamente significative. La situazione è ancora diversa quando si considera il consumo di pesci/crostacei durante i tre giorni precedenti il prelievo: si osserva un aumento statisticamente significativo della MG di As_i tra le femmine dell'Amiata e di Gela (anche se l'Amiata presenta valori sempre inferiori al cut-off) e a Viterbo nel suo complesso, con valori sempre superiori al cut-off.

Per quanto riguarda frutta e verdura, si osserva un aumento sta-

tisticamente significativo delle MG di As_i per i maschi di tutte le aree che consumano verdure fresche di produzione propria/locale e tra le femmine di tutte le aree che consumano frutta.

Infine, l'analisi dei **marcatori genetici** ha rivelato un'associazione statisticamente significativa solo tra polimorfismo GST-T e arsenico.

CARATTERIZZAZIONE DEI SOGGETTI CON ASI >3,86 µG/L IN ASSOCIAZIONE A FATTORI DI ESPOSIZIONE INDIVIDUATI ALL'INTERNO DEL QUESTIONARIO

Le analisi sono state effettuate su un totale di 267 soggetti, 130 dei quali maschi. Sono di seguito commentate le associazioni statisticamente significative ($p < 0,05$) tra As_i ($> o < il cut-off di 3,86 µg/l$) ed esposizione a variabili indagate mediante questionario relative ai risultati riportati in **tabella 22**.

Le risposte alle variabili sull'uso di acqua non evidenziano risultati significativi analizzando il campione nel suo complesso, mentre emergono alcune associazioni significative nel campione del Viterbese (RP >3,8 sia per uso di acqua di acquedotto sia per uso di acqua di pozzo; RP=0,24 per uso di acqua in bottiglia).

Esposizioni lavorative significative sono risultate per:

- asbesto o amianto (D1a.2) su tutto il campione con un RP=1,97 e nel campione di Taranto con un RP=2,7;
- polveri, sostanze chimiche, gas (D1) e silice, lana di vetro (D1a.1) polveri di metallo (D1a.4) nell'intero campione con probabilità tra il 5% e il 10%;
- derivati del petrolio (D1a.5) nell'intero campione con un RP=2,36 e nel campione di Gela con RP=1,86;
- solventi organici, tinture, acidi (D1a.7) nel campione totale con un RP=1,89 e in quello di Viterbo con RP=5,1;
- esalazioni auto, altri gas o fumi (D1a.6) nel campione totale con RP=1,79;
- polveri di legno e carbone (D1a.8) nel campione totale con RP=1,75;
- lavoro in impianti trattamento dei rifiuti (D3) nel campione totale con RP=1,89;
- lavoro in industria chimica (D6) nel campione totale con RP=3,15 e in quello di Gela con RP=2,43.

Per il **consumo di prodotti alimentari** emergono risultati significativi riferiti a:

- latte intero di produzione propria/locale (H1.aP) e prodotti a base di maiale di produzione propria/locale (H1.jP) nel campione dell'Amiata con RP >4;
- pesce (H1.o) nel campione totale con RR=1,98 e nei campioni di Viterbo (RP=3,4) e Gela (RP=1,7);
- pesce/crostacei 3 giorni prima del prelievo (L3-L4) nel campione totale con RP=2,0 nel campione dell'Amiata (RP=4,19) e in quello viterbese (RP=26, sorretto da un solo soggetto con As_i >3,86 µg/l tra i non assuntori);
- molluschi e crostacei (H1.p) nell'Amiata con un RP=5,40;
- frutta (H1.t) nel campione di Taranto con un RP=0,35.

L'analisi della distribuzione dei polimorfismi genetici non ha messo in luce risultati significativi sul campione complessivo. Per il GST-T è da segnalare un RP=2,15 nel campione di Gela in controtendenza rispetto al RP=0,63 emerso sul campione totale.

ANALISI DI ASSOCIAZIONI TRA FATTORI DI ESPOSIZIONE E CONCENTRAZIONE DI ARSENICO TENENDO CONTO DI FATTORI DI CONFONDIMENTO O DI MODIFICAZIONE DI EFFETTO

Le analisi sono state svolte su 267 soggetti per cui sono presenti i dati di campionamento biologico, il questionario e i dati di suscettibilità genetica.

Fattori di aggiustamento e arsenico

La **tabella 23** riporta le MG e i RMG grezzi di alcune caratteristiche individuali ritenute, sulla base delle analisi precedenti, fattori di aggiustamento nell'associazione tra arsenico e variabili di esposizione selezionate dal questionario.

Come mostrato in **tabella 23**, la concentrazione di As_i è significativamente diversa sia tra le aree sia tra generi. Tra le diverse classi di età non si rilevano differenze statisticamente significative tra le MG di As_i. I soggetti che hanno dichiarato di avere consumato pesce e/o crostacei nei tre giorni precedenti il prelievo hanno una MG di As_i significativamente superiore rispetto alla MG dei soggetti che non hanno mangiato pesce.

Considerando i diversi marcatori genetici, i soggetti portatori del genotipo *wild-type* per il gene GST-T1 (GST-T+) hanno una MG di As_i significativamente inferiore del 34% rispetto ai soggetti portatori del genotipo nullo (GST-T-).

I soggetti portatori dell'allele mutato AS3MT287Thr hanno una MG di As_i del 24% superiore rispetto ai soggetti portatori dell'allele *wild-type* AS3MT287Met, anche se tale differenza non risulta statisticamente significativa. Risultati simili si ottengono considerando As_i+MMA+DMA.

Sulla base dei risultati ottenuti si è deciso di utilizzare l'area di appartenenza, il sesso, il consumo di pesce, i polimorfismi AS3MT e GST-T, come cofattori di aggiustamento nel calcolo dei RMG aggiustati riportati nei paragrafi successivi.

Acqua e arsenico

L'Allegato 22 riporta le MG e i RMG sia grezzi sia aggiustati per le variabili per cui è ipotizzabile un'associazione con As_i e As_i+MMA+DMA. Di seguito sono riportati solo i commenti relativi alle variabili che presentano RMG statisticamente significativi ($p < 0,05$) o ai limiti della significatività ($p < 0,10$) e con un numero di casi maggiore o uguale a 3. I grafici dei RMG sono riportati nell'Allegato 23.

Considerando tutte le aree si evidenzia una diminuzione significativa del 38% della MG ($n_{esp}=65$, $n_{nonesp}=202$, $p=0,019$) per i soggetti che bevono acqua dell'acquedotto: 51% nei maschi bevitori di acqua dell'acquedotto ($n_{esp}=35$, $n_{nonesp}=95$, $p=0,007$). Tali significatività scompaiono dopo aggiustamento del RMG. La situazione è tuttavia molto variabile tra aree:

- nell'Amiata le femmine che bevono acqua dell'acquedotto hanno una MG del 113% più alta rispetto alle non consumatrici di acqua dell'acquedotto, anche se ai limiti della significatività statistica ($n_{esp}=16$, $n_{nonesp}=14$, $p=0,053$). Dopo aggiustamento del RMG tale aumento si riduce al 75%, non più statisticamente significativo. Da notare che la MG di As_i negli esposti ha un valore ridotto (MG_{esp}=1,052).
- nell'area di Viterbo i soggetti che bevono acqua dell'acquedot-

Variabile	Descrizione variabile	n-esp	tot-esp	esposti %	n-non-esp	tot-non-esp	non-esposti %	RP	p	sign.	note
B11.1	Beve acqua di acquedotto pubblico	13	65	20,00	55	202	27,23	0,73	0,245	ns	Viterbo 2/4 vs 9/68 *
B11.2	Beve acqua di pozzo	1	2	50,00	67	265	25,28	1,98	0,424	ns	Viterbo 1/1 vs 10/71 **
B11.3	Beve acqua imbottigliata	55	208	26,44	13	59	22,03	1,20	0,493	ns	Viterbo 8/66 vs 3/6 *
B12.1	Cucina con acqua di acquedotto pubblico	44	180	24,44	24	87	27,59	0,89	0,581	ns	Viterbo 9/38 vs 2/34 *
B12.2	Cucina con acqua di pozzo	1	4	25,00	67	263	25,48	0,98	0,983	ns	
B12.3	Cucina con acqua imbottigliata	25	84	29,76	43	183	23,50	1,27	0,275	ns	
D1	Espos. occup. polveri, sost. chim., gas...	35	114	30,70	33	153	21,57	1,42	0,090	+	
D1a.1	Espos. occup. silice, lana di vetro	13	33	39,39	55	234	23,50	1,68	0,050	+	
D1a.2	Espos. occup. asbesto o amianto	14	31	45,16	54	236	22,88	1,97	0,007	**	Taranto 4/6 vs 11/44 *
D1a.3	Espos. occup. berillio	4	9	44,44	64	258	24,81	1,79	0,184	ns	
D1a.4	Espos. occup. polveri di metallo	15	41	36,59	53	226	23,45	1,56	0,076	+	
D1a.5	Espos. occup. derivati del petrolio	17	33	51,52	51	234	21,79	2,36	0,000	***	Gela 14/23 vs 21/64 *
D1a.6	Espos. occup. esalaz. auto, altri gas o fumi	17	42	40,48	51	225	22,67	1,79	0,015	*	
D1a.7	Espos. occup. solventi organici, tinture, acidi	21	51	41,18	47	216	21,76	1,89	0,004	**	Viterbo 2/3 vs 9/69 *
D1a.8	Espos. occup. polveri di legno, carbone	16	40	40,00	52	227	22,91	1,75	0,022	*	
D1a.9	Espos. occup. radiazioni ionizzanti	6	16	37,50	62	251	24,70	1,52	0,255	ns	
D1a.10	Espos. occup. radiazioni non ionizzanti	8	25	32,00	60	242	24,79	1,29	0,431	ns	
D2	Avvelenam. o malattia da esposiz. occupaz.	6	15	40,00	62	252	24,60	1,63	0,184	ns	
D3	Lavoro in impianto trattam. rifiuti	6	13	46,15	62	254	24,41	1,89	0,079	+	
D4	Lavoro in azienda agricola	4	21	19,05	64	246	26,02	0,73	0,482	ns	
D5	Utilizzo pesticidi oltre lavoro	8	25	32,00	60	242	24,79	1,29	0,431	ns	
D6	Lavoro in industria prodotti chimici	15	22	68,18	53	245	21,63	3,15	0,000	***	Amiata 1/2 vs 6/56 +; Gela 13/17 vs 22/70 ***
F1	Fumo	24	89	26,97	44	178	24,72	1,09	0,691	ns	
F4	Birra	5	11	45,45	63	256	24,61	1,85	0,120	ns	
F7	Caffè	52	202	25,74	16	64	25,00	1,03	0,906	ns	
H1.a	Latte intero	18	65	27,69	50	202	24,75	1,12	0,636	ns	
H1.aP	Latte intero produzione propria/locale	4	9	44,44	64	258	24,81	1,79	0,184	ns	Amiata 3/7 vs 4/51 **
H1.b	Latte scremato	35	140	25,00	33	127	25,98	0,96	0,854	ns	
H1.bP	Latte scremato produzione propria/locale	3	11	27,27	66	256	25,78	1,06	0,888	ns	Amiata 3/10 vs 4/48 +
H1.e	Formaggio	56	231	24,24	12	36	33,33	0,73	0,244	ns	Amiata 5/53 vs 2/5 *
H1.eP	Formaggio produzione propria/locale	6	27	22,22	62	240	25,83	0,86	0,683	ns	
H1.j	Maiale	44	177	24,86	24	90	26,67	0,93	0,749	ns	Amiata 7/42 vs 0/16 +
H1.jP	Maiale produzione propria/locale	5	18	27,78	63	249	25,30	1,10	0,816	ns	Amiata 3/11 vs 4/47 +
H1.m	Prodotti a base di maiale	54	211	25,59	14	56	25,00	1,02	0,928	ns	
H1.mP	Prodotti a base di maiale produzione propria/locale	3	12	25,00	65	255	25,49	0,98	0,970	ns	Amiata 3/9 vs 4/49 *
H1.o	Pesce	59	205	28,78	9	62	14,52	1,98	0,024	*	Viterbo 11/55 vs 0/17 *; Gela 28/61 vs 7/26 +
H1.oP	Pesce produzione propria/locale	18	55	32,73	50	212	23,58	1,39	0,166	ns	
H1.p	Molluschi e crostacei	23	87	26,44	45	180	25,00	1,06	0,801	ns	
H1.pP	Molluschi e crostacei prod. propria/locale	7	30	23,33	61	237	25,74	0,91	0,776	ns	Amiata 2/4 vs 5/54 *
H1.r	Verdure fresche	60	243	24,69	8	24	33,33	0,74	0,354	ns	
H1.rP	Verdure fresche produzione propria/locale	23	72	31,94	45	195	23,08	1,38	0,140	ns	
H1.s	Verdure cotte	52	219	23,74	16	48	33,33	0,71	0,167	ns	
H1.sP	Verdure cotte produzione propria/locale	19	67	28,36	49	200	24,50	1,16	0,530	ns	
H1.t	Frutta	59	243	24,28	9	24	37,50	0,65	0,156	ns	Taranto 12/46 vs 3/4 *
H1.tP	Frutta produzione propria/locale	19	64	29,69	49	203	24,14	1,23	0,374	ns	
H1.w	Cereali	35	126	27,78	33	141	23,40	1,19	0,413	ns	
H1.x	Pasta, pane	67	257	26,07	1	10	10,00	2,61	0,252	ns	
H1.xP	Pasta, pane produzione propria/locale	9	23	39,13	59	244	24,18	1,62	0,116	ns	Amiata 3/11 vs 4/47 +
L3-L4	Pesce/crostacei 3 gg. prima del prelievo	26	63	41,27	42	204	20,59	2,00	0,001	**	Amiata 4/14 vs 3/44 +; Viterbo 10/20 vs 1/52 ***
	Polimorfismo	n-esp	tot-esp	esposti	n-non-esp	tot-non-esp	non-esposti	RP	p	Sign.	Note
AS3MT		23	79	29,11	45	188	23,94	1,22	0,375	ns	
GST-T		47	208	22,60	21	59	35,59	0,63	0,043	*	Gela 12/17 vs 23/70 **
GST-M		34	153	22,22	34	114	29,82	0,75	0,158	ns	

n-esp: numerosità dei soggetti con valori di Asi $\geq 3,86$ µg/l esposti alla variabile; tot-esp totale dei soggetti esposti alla variabile; n-non-esp: numerosità dei soggetti con valori di Asi $\geq 3,86$ µg/l non esposti alla variabile; tot-non-esp: totale dei soggetti non esposti alla variabile; Sign: significatività statistica; ns: non statisticamente significativo; + p < 0,1; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; RP: rapporto tra prevalenze.

n-esp: number of subjects with iAs $\geq 3,86$ µg/l exposed to the variable; tot-esp: total of the subjects exposed to the variable; n-non-esp: number subjects with iAs $\geq 3,86$ µg/l not exposed to the variable; tot-non-esp: total of the subjects not exposed to the variable; Sign: Statistically significant; ns: not statistically significant; + p < 0,1; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; RP: prevalence rate.

Tabella 22. Valutazione delle associazioni tra Asi (< o $\geq 3,86$ µg/l) e i fattori di esposizione individuati all'interno del questionario.

Table 22. Assessment of associations among iAs (< o $\geq 3,86$ µg/l) and exposure factors identified within the questionnaire.

Tabella 23. MG e RMG grezzo per zona, sesso, consumo di pesce nei tre giorni precedenti il prelievo, AS3MT e GST-T.

Variabili in associazione con As _i		n	%	MG	IC95%	RMG grezzo	p	IC95%
Zona	Amiata	58	21,7	0,86	0,61-1,21	1		
	Viterbo	72	27	1,93	1,42-2,62	2,24	0,001	1,42-3,53
	Taranto	50	18,7	3,13	2,17-4,51	3,63	<0,001	2,21-5,97
	Gela	87	32,6	3,42	2,59-4,51	3,97	<0,001	2,56-6,14
Sesso	F	137	51,3	1,75	1,39-2,21	1		
	M	130	48,7	2,64	2,07-3,35	1,50	0,017	1,08-2,11
consumo nei 3 gg. precedenti il prelievo biologico	no	204	76,4	1,82	1,5-2,2			
	si	63	23,6	3,62	2,57-5,1	1	0,001	1,35-2,95
AS3MT	Met/Met	188	70,4	2,00	1,64-2,45	1		
	Thr/Thr	79	29,6	2,49	1,82-3,4	1,24	0,251	0,86-1,8
GST-T	-	59	22,1	3,04	2,12-4,34	1		
	+	208	77,9	1,93	1,6-2,34	0,64	0,03	0,42-0,96

Table 23. Geometric mean (MG) and geometric mean ratio (RMG) by area, sex, fish consumption three days before the sampling, AS3MT and GST-T1.

to hanno una MG del 151% più elevata rispetto ai soggetti non bevitori di acqua dell'acquedotto, anche se non c'è significatività statistica. Dopo aggiustamento del RMG tale aumento si riduce al 66%. Da segnalare la presenza di una donna con un valore di As_i molto elevato che ha dichiarato di bere e cucinare con acqua del pozzo (MG_{esp}=105,60).

Nell'Amiata le femmine che hanno dichiarato di bere acqua minerale imbottigliata hanno una MG del 71% significativamente più bassa (n_{esp}=18, n_{nonesp}=12, p=0,001) rispetto alle non consumatrici. Dopo aggiustamento del RMG il decremento scende al 60%, mantenendo la significatività statistica (p=0,015).

Nell'area di Viterbo i soggetti che hanno dichiarato di bere acqua minerale imbottigliata hanno una MG del 74% significativamente più bassa (n_{esp}=66, n_{nonesp}=6, p=0,003) rispetto ai non consumatori; dopo aggiustamento del RMG la differenza si attesta intorno a un 46% non statisticamente significativo.

Nella zona di Viterbo i soggetti che hanno dichiarato di utilizzare acqua dell'acquedotto per cucinare hanno una MG dell'88% significativamente più elevata (n_{esp}=38, n_{nonesp}=34, p=0,015) rispetto ai non consumatori; dopo aggiustamento del RMG la differenza scende al 50%, pur mantenendo la significatività statistica (p=0,050). Da notare che a fronte del commentato eccesso significativo della MG il valore di MG di 2,6 µg/l dei soggetti esposti è inferiore al valore di riferimento di 3,86 µg/l ma superiore al valore SIVR di 1,5 µg/l.

Per i maschi di Taranto che hanno dichiarato di utilizzare acqua dell'acquedotto per cucinare si è osservata una MG più alta del 346% rispetto ai non consumatori; dopo aggiustamento tale percentuale sale al 434% (n_{esp}=21, n_{nonesp}=3, p=0,100).

Lavoro e arsenico

I soggetti che hanno dichiarato di essere stati esposti a **polveri, sostanze chimiche, gas o radiazioni** hanno una MG significativamente superiore del 47% (n_{esp}=114, n_{nonesp}=153, p=0,028) rispetto ai soggetti non esposti a tali fattori. Dopo aggiustamento del RMG l'aumento del 16% non risulta più significativo. Nell'area di Taranto questi soggetti hanno una MG superiore del 109% rispetto ai soggetti non esposti, (n_{esp}=22, n_{nonesp}=28,

p=0,096); dopo aggiustamento del RMG la differenza permane intorno al 112%, ai limiti della significatività statistica.

Nel campione complessivo i maschi che hanno dichiarato di essere stati esposti a **silice o lana di vetro** hanno una MG significativamente superiore del 67% rispetto ai maschi non esposti a tali fattori (n_{esp}=33, n_{nonesp}=97, p=0,057); dopo aggiustamento del RMG la differenza perde la significatività statistica.

Nell'area di Taranto gli uomini che hanno dichiarato di essere stati esposti a silice o lana di vetro hanno una MG significativamente superiore del 195% rispetto ai non esposti (n_{esp}=8, n_{nonesp}=16, p=0,094); l'eccesso cresce al 257% con l'aggiustamento del RMG (p=0,085).

Tra gli uomini che hanno dichiarato di essere stati esposti ad **asbesto o amianto** si osserva una MG significativamente superiore dell'87% rispetto ai non esposti (n_{esp}=31, n_{nonesp}=99, p=0,023); a seguito di aggiustamento del RMG la differenza perde la significatività statistica.

Nell'area di Taranto gli uomini che hanno dichiarato di essere stati esposti ad asbesto o amianto hanno una MG significativamente superiore del 289% rispetto ai maschi non esposti (n_{esp}=6, n_{nonesp}=18, p=0,051); la differenza cresce al 369% con l'aggiustamento del RMG (p=0,053).

I soggetti che hanno dichiarato di essere stati esposti **polveri di metallo** hanno una MG significativamente superiore del 57% rispetto ai soggetti non esposti (n_{esp}=41, n_{nonesp}=226, p=0,060); tale differenza non risulta significativa dopo aggiustamento.

Tra gli uomini che hanno dichiarato di essere stati esposti a **derivati del petrolio** si osserva una MG significativamente superiore del 139% rispetto ai non esposti (n_{esp}=33, n_{nonesp}=97, p=0,001); con l'aggiustamento del RMG l'incremento si riduce al 50% e perde la significatività statistica.

Tra gli uomini di Gela che hanno dichiarato di essere stati esposti a derivati del petrolio emerge una MG superiore del 71% rispetto ai non esposti, anche se tale risultato non è statisticamente significativo; dopo aggiustamento emerge una MG significativamente superiore del 73% rispetto ai non esposti (n_{esp}=23, n_{nonesp}=23, p=0,082).

I soggetti che hanno dichiarato di essere stati esposti a **esalazioni**

di gas o fumi hanno una MG significativamente superiore dell'87% rispetto ai non esposti ($n_{\text{esp}}=42$, $n_{\text{nonesp}}=225$, $p=0,008$); dopo aggiustamento il RMG non risulta più significativo.

I soggetti che hanno dichiarato una esposizione a **solventi organici, tinture, acidi** mostrano una MG significativamente superiore del 108% rispetto ai soggetti non esposti ($n_{\text{esp}}=51$, $n_{\text{nonesp}}=216$, $p=0,001$); dopo l'aggiustamento il differenziale si riduce al 55% rimanendo statisticamente significativo ($p=0,037$). Per le femmine esposte l'aumento è significativo ed è pari al 102% dopo l'aggiustamento del RMG ($n_{\text{esp}}=18$, $n_{\text{nonesp}}=119$, $p=0,042$).

I soggetti di Viterbo che hanno dichiarato di essere stati esposti a solventi organici, tinture, acidi hanno una MG significativamente superiore del 672% rispetto ai soggetti non esposti ($n_{\text{esp}}=3$, $n_{\text{nonesp}}=69$, $p=0,001$). Dopo l'aggiustamento il RMG permane significativo con un eccesso tra esposti e non esposti del 316% ($p=0,017$), ma è opportuno sottolineare che tale risultato è basato su solo 3 soggetti che hanno dichiarato di essere stati esposti.

Nel campione di donne di Taranto che hanno dichiarato di essere state esposte a solventi organici, tinture, acidi è risultata una MG significativamente superiore del 323% rispetto alle non esposte dopo aggiustamento del RMG ($n_{\text{esp}}=6$, $n_{\text{nonesp}}=20$, $p=0,092$).

Gli uomini che hanno dichiarato di essere stati esposti a **polvere di legno o di carbone** hanno una MG significativamente superiore del 65% rispetto ai maschi non esposti ($n_{\text{esp}}=36$, $n_{\text{nonesp}}=94$, $p=0,055$); il risultato perde di significatività dopo l'aggiustamento del RMG. Tra gli uomini che hanno dichiarato di aver lavorato in un'**industria di prodotti chimici** la MG è risultata significativamente superiore del 235% rispetto ai non esposti ($n_{\text{esp}}=21$, $n_{\text{nonesp}}=109$, $p < 0,001$); il risultato permane significativo dopo aggiustamento del RMG ($p=0,008$).

A Gela gli uomini esposti mostrano una MG significativamente superiore del 162% rispetto ai non esposti ($n_{\text{esp}}=17$, $n_{\text{nonesp}}=29$, $p=0,005$), che si riduce al 145% dopo aggiustamento del RMG rimanendo statisticamente significativa ($p=0,005$).

E' rilevante considerare che tutte le precedenti variabili sono indicatori indiretti di esposizione ad As e sono da utilizzare sia per una descrizione generale del campione studiato sia per una caratterizzazione delle quattro aree.

Dieta e arsenico

I commenti che seguono sono riferiti alle analisi delle risposte aggregate su due soli livelli di «non consumo» o «consumo» una o più volte su base settimanale. Questa scelta comporta da una parte, la maggiore rappresentatività numerica della categoria considerata esposta, dall'altra la perdita del riferimento alla quantità di consumo. I risultati statisticamente significativi hanno valore descrittivo e sono indicativi per ulteriori analisi.

Nel complesso delle quattro aree, le donne che consumano **latte intero** hanno una MG significativamente superiore del 106% rispetto alle non consumatrici ($n_{\text{esp}}=29$, $n_{\text{nonesp}}=108$, $p=0,016$); l'eccesso cresce al 153% con l'aggiustamento del RMG ($p < 0,001$). Per le donne dell'Amiata l'eccesso è del 126% ($n_{\text{esp}}=7$, $n_{\text{nonesp}}=23$, $p=0,080$) che si riduce al 71% con l'aggiustamento, perdendo la significatività statistica.

Per le donne dell'area di Viterbo l'eccesso è del 140% ($n_{\text{esp}}=10$, $n_{\text{nonesp}}=30$, $p=0,020$) dopo l'aggiustamento.

Nel campione di Taranto l'eccesso è del 191% ($n_{\text{esp}}=10$, $n_{\text{nonesp}}=40$, $p=0,05$) che cresce al 221% dopo l'aggiustamento ($p=0,049$). Nelle femmine di Gela l'eccesso è del 321% ($n_{\text{esp}}=5$, $n_{\text{nonesp}}=36$, $p=0,057$) che raggiunge il 244% con l'aggiustamento ($p=0,071$). Negli uomini di Taranto che hanno dichiarato di consumare **latte scremato** la MG risulta significativamente superiore del 290% ($n_{\text{esp}}=7$, $n_{\text{nonesp}}=17$, $p=0,039$), 359% dopo aggiustamento ($p=0,035$), rispetto ai non consumatori.

Nei maschi di Taranto che hanno dichiarato di consumare **pollami** la MG risulta superiore del 206% (242% dopo aggiustamento) rispetto ai non consumatori, aumenti non statisticamente significativi ($n_{\text{esp}}=18$, $n_{\text{nonesp}}=6$).

Le donne dell'Amiata che hanno dichiarato di consumare **carne di manzo** hanno una MG significativamente superiore del 130% dopo aggiustamento ($n_{\text{esp}}=20$, $n_{\text{nonesp}}=10$, $p=0,039$). Da segnalare che i soggetti esposti hanno una MG di 0,86 µg/l, inferiore ai valori di riferimento di 1,5 µg/l e 3,86 µg/l.

I soggetti dell'Amiata che hanno dichiarato di consumare **carne di maiale** mostrano un eccesso significativamente superiore del 92% rispetto ai non consumatori ($n_{\text{esp}}=42$, $n_{\text{nonesp}}=16$, $p=0,053$), che scende al 61%, non più statisticamente significativo, dopo aggiustamento. Da segnalare che tra i soggetti esposti la MG è di 1,03 µg/l, inferiore ai valori di riferimento di 1,5 µg/l e 3,86 µg/l.

A Taranto i maschi che hanno dichiarato di mangiare **carne di cavallo** hanno una MG significativamente superiore del 223% ($n_{\text{esp}}=6$, $n_{\text{nonesp}}=18$, $p=0,095$), 316% dopo aggiustamento ($p=0,068$), rispetto ai non consumatori.

Nel campione complessivo i soggetti che hanno dichiarato di mangiare **pesce** la MG è significativamente superiore del 46% ($n_{\text{esp}}=205$, $n_{\text{nonesp}}=62$, $p=0,063$) e 51% dopo aggiustamento ($p=0,027$), rispetto ai non consumatori. Tra i maschi l'eccesso è dell'85% ($n_{\text{esp}}=103$, $n_{\text{nonesp}}=27$, $p=0,033$) e 105% dopo aggiustamento ($p=0,007$).

I maschi di Viterbo hanno una MG significativamente superiore del 139% rispetto ai non consumatori ($n_{\text{esp}}=26$, $n_{\text{nonesp}}=6$, $p=0,081$), ma l'aggiustamento riduce l'eccesso al 63%, non più statisticamente significativo.

I soggetti di Gela mostrano un eccesso non significativo della MG del 61%, che sale al 71% ai limiti della significatività statistica ($n_{\text{esp}}=61$, $n_{\text{nonesp}}=26$, $p=0,090$). L'eccesso tra i maschi è del 144%, statisticamente significativo, dopo l'aggiustamento ($n_{\text{esp}}=33$, $n_{\text{nonesp}}=13$, $p=0,010$).

Nelle femmine di Gela che hanno dichiarato di consumare **vino** la MG risulta superiore del 233% (178% dopo aggiustamento) rispetto alle non consumatrici, anche se tale aumento non è statisticamente significativo.

Consumi di alimenti di produzione propria o locale

Il consumo di **latte intero di produzione propria/locale** ha mostrato medie di As_i significativamente più elevate del 212% tra i consumatori del campione complessivo rispetto ai non consumatori solo dopo aggiustamento ($n_{\text{esp}}=9$, $n_{\text{nonesp}}=258$, $p=0,010$). In particolare:

■ nell'area dell'Amiata i soggetti con consumo di latte intero di produzione propria/locale hanno una MG significativamente superiore del 306% rispetto ai non consumatori ($n_{\text{esp}}=7$, $n_{\text{nonesp}}=51$, $p=0,002$); il risultato rimane invariato dopo l'aggiustamento del RMG.

L'eccesso è confermato sia tra i maschi (+341% dopo aggiustamento, $n_{esp}=4$, $n_{nonesp}=24$, $p=0,026$) sia tra le femmine (+341% dopo aggiustamento $n_{esp}=3$, $n_{nonesp}=27$, $p=0,024$).

I soggetti in Amiata che hanno dichiarato di consumare **latte scremato di produzione propria/locale** mostrano un eccesso del 104% ($n_{esp}=10$, $n_{nonesp}=48$, $p=0,056$) e del 340% tra gli uomini ($n_{esp}=4$, $n_{nonesp}=24$, $p=0,026$), dopo aggiustamento.

Nella valutazione delle associazioni che emergono nell'Amiata tra consumo dichiarato di prodotti locali e livelli di As misurati è importante considerare la presenza di quattro uomini che dichiarano il consumo di latte, mozzarella, burro, maiale, agnello e cavallo di produzione locale.

I soggetti di Taranto che hanno dichiarato di mangiare **pesce di produzione propria/locale** hanno una MG significativamente superiore del 186% ($n_{esp}=40$, $n_{nonesp}=10$, $p=0,055$) rispetto ai non consumatori e del 202% dopo aggiustamento ($p=0,071$).

I soggetti che hanno dichiarato di mangiare **verdura fresca di produzione propria/locale** hanno una MG significativamente superiore del 49% rispetto ai non consumatori ($n_{esp}=72$, $n_{nonesp}=195$, $p=0,040$), e del 56% dopo aggiustamento ($p=0,031$). In particolare:

- le donne hanno una MG significativamente superiore dell'81% ($n_{esp}=37$, $n_{nonesp}=100$, $p=0,030$), 86% dopo aggiustamento ($p=0,026$), rispetto ai soggetti non consumatori;

- le donne di Viterbo hanno una MG significativamente superiore del 188% ($n_{esp}=4$, $n_{nonesp}=36$, $p=0,072$), 152% sempre significativo dopo aggiustamento ($p=0,066$), rispetto alle non consumatrici. Gli uomini che hanno dichiarato di mangiare **frutta fresca di produzione propria/locale** hanno una MG significativamente superiore del 104% rispetto ai soggetti non consumatori ($n_{esp}=36$, $n_{nonesp}=94$, $p=0,027$). Il dato complessivo non è significativo in nessuna delle quattro aree.

Gli uomini che hanno dichiarato di mangiare **pane/pasta di produzione propria/locale** hanno una MG significativamente superiore del 191% rispetto ai non consumatori ($n_{esp}=12$, $n_{nonesp}=118$, $p=0,006$). Tale risultato è confermato nel campione dei maschi di Taranto ($n_{esp}=6$, $n_{nonesp}=118$, $p=0,081$).

Le analisi per $As_i + MMA + DMA$ sono risultate sovrapponibili a quelle di As_i , come osservato anche nello studio esplorativo, pertanto tali analisi non sono presentate.

Considerazioni finali sulle analisi di associazioni tra fattori di esposizione e concentrazione di arsenico tenendo conto di fattori di confondimento o di modificazione di effetto

Per quanto riguarda l'uso di acqua sono da segnalare l'associazione inversa emersa per l'uso di acqua minerale per i soggetti dell'Amiata e di Viterbo e l'associazione diretta con l'uso di acqua di acquedotto per bere e cucinare da parte dei soggetti di Viterbo.

Per quanto riguarda l'esposizione lavorativa, appaiono rilevanti le indicazioni emerse per gli uomini dei campioni di Taranto e Gela che hanno mostrato eccessi del valore medio di As_i in associazione a diverse esposizioni occupazionali autodichiarate, quali silice o lana di vetro, asbesto, derivati del petrolio, prodotti chimici. Per le donne dei campioni di Viterbo e Taranto emerge un segnale considerando l'esposizione a solventi organici, tinture, acidi, sebbene sostenuto da pochi casi.

Nel valutare i risultati di maggiore interesse emersi dall'analisi delle domande del questionario riguardanti i consumi di alimenti occorre considerare che il consumo su base settimanale include livelli da bassi a elevati di consumo e che l'informazione sul consumo di prodotti locali rappresenta una voce esposta a forte soggettività. Tuttavia alcuni risultati sono ritenuti degni di attenzione, soprattutto quando risultano in linea con le conoscenze disponibili.

Indicazioni di interesse per l'associazione con livelli medi di As_i emergono per il consumo di latte, in prevalenza intero, sia per le donne sul campione totale e dell'area di Viterbo sia per l'insieme dei due sessi nei campioni di Taranto e Gela.

Il consumo di pesce è risultato associato a maggiori valori di As_i nel campione complessivo e nel campione di Gela, in particolare tra gli uomini.

Altri risultati di potenziale interesse emersi per il consumo di latticini, carne di manzo, di maiale e di agnello nell'Amiata, sono sostenuti da valori medi di As_i bassi rispetto ai riferimenti e/o basati su un numero di soggetti/campioni troppo piccolo per consentire speculazioni. I risultati significativi ottenuti per il consumo di pollo e di cavallo a Taranto e di vino a Gela, invece, forniscono indicazioni per ulteriori approfondimenti.

La valutazione dell'informazione sul tipo di produzione «propria o locale» evidenzia risultati di interesse per la verdura fresca, che risulta associata a valori medi di As_i più elevati tra i consumatori del campione complessivo delle quattro aree, in particolare tra le femmine, tra le donne del Viterbese e nel campione complessivo di Taranto. Il risultato emerso sul campione complessivo è rafforzato considerando il consumo di frutta fresca. A Taranto si osservano, inoltre, valori medi di As_i più elevati tra i consumatori di pesce di produzione propria/locale.

Analogo risultato è emerso per il consumo di pane e pasta di produzione propria/locale, che però risulta solo tra i maschi totali e di Taranto.

Il consumo di latte intero di produzione propria/locale ha mostrato un'associazione con il livello di As_i nel campione totale e in quello dell'Amiata, per ambedue i sessi.

Correlazione tra variabili risultate più informative dalle analisi univariate e multilineri

Dalle analisi univariate e multilineri sono risultate statisticamente significative le seguenti associazioni tra variabili (tabella 24):

- bere acqua di acquedotto pubblico con AS_{3MT} nell'Amiata e Taranto;
- bere acqua di acquedotto pubblico con bere acqua di pozzo nel Viterbese e a Gela;
- consumo di acqua di pozzo con AS_{3MT} nell'Amiata;
- consumo di pesce/crostacei nei tre giorni precedenti il prelievo con uso di acqua dell'acquedotto pubblico per cucinare nel campione dell'Amiata, con AS_{3MT} a Taranto, con GST-T a Gela;
- consumo di pesce con GST-T nell'Amiata, oltre che con consumo di pesce/crostacei nei tre giorni precedenti il prelievo a Viterbo;
- esposizioni professionali a polveri, sostanze chimiche, gas o radiazioni con consumo di pesce nell'Amiata, con occupazione in industria chimica e AS_{3MT} a Gela;

Area	Variabili	B11.1	B12.1	D1	D6	H1.o	L3-L4	AS3MT
AMIATA	B12.1	0,19						
	D1	0,95	0,49					
	D6	0,29	0,85	0,60				
	H1.o	0,66	0,65	0,21	0,52			
	L3-L4	0,50	0,08	0,00	0,39	0,05		
	AS3MT	0,04	0,02	0,47	0,18	0,14	0,13	
	GST-T	0,50	0,58	0,79	0,39	0,00	0,79	0,33
VITERBO	B12.1	0,05						
	D1	0,39	0,76					
	D6	0,81	0,35	0,51				
	H1.o	0,26	0,60	0,63	0,07			
	L3-L4	0,31	0,20	0,95	0,54	0,02		
	AS3MT	0,60	0,12	0,90	0,44	0,14	0,79	
	GST-T	0,58	0,44	0,25	0,67	0,29	0,45	0,45
TARANTO	B12.1	0,30						
	D1	0,42	0,12					
	D6	0,40	0,72	0,11				
	H1.o	0,59	0,49	0,98	0,51			
	L3-L4	0,15	0,63	0,91	0,01	0,08		
	AS3MT	0,03	0,96	0,98	0,33	0,50	0,07	
	GST-T	0,70	0,23	0,76	0,63	0,11	0,86	0,73
GELA	B12.1	0,04						
	D1	0,72	0,75					
	D6	0,36	0,82	0,01				
	H1.o	0,62	0,44	0,91	0,22			
	L3-L4	0,83	0,65	0,77	0,32	0,35		
	AS3MT	0,69	0,71	0,01	0,87	0,33	0,37	
	GST-T	0,49	0,44	0,11	0,83	0,59	0,10	0,32

In tabella è riportato il p-value del test del chi-quadro (test esatto di Fisher, ove opportuno)
 B11.1 – beve acqua di acquedotto pubblico;
 B12.1 – cucina con acqua di acquedotto pubblico
 D1 – esposizione occupazionale a polveri, sostanze chimiche, gas o radiazioni;
 D6 – esperienza lavorativa in industria di prodotti chimici;
 H1.o – consumo di pesce almeno una volta alla settimana;
 L3-L4 – consumo di pesce/crostacei nei tre giorni precedenti il prelievo;
 AS3MT – polimorfismo di AS3MT (Met287Thr);
 GST-T – polimorfismo di delezione.

In colore sono evidenziate le correlazioni statisticamente significative (p <0,05).

Table shows the p-value of the chi-square test (Fisher exact test, where appropriate)
 B11.1 – drinking water from public water supply;
 B12.1 – cooking with water from public water supply;
 D1 – occupational exposure to dusts, chemicals, gases or radiations;
 D6 – work experience in chemical industry;
 H1.o – fish consumption at least once a week;
 L3-L4 – fish/crustaceans during three days before the sampling;
 AS3MT – AS3MT polymorphism (Met287Thr);
 GST-T – deletion polymorphism.

The statistically significant associations (p <0,05) are shown in colour.

Tabella 24. Matrice di associazione tra le variabili del questionario selezionate.

Table 24. Association matrix among variables selected from the questionnaire.

- lavoro in industria chimica e consumo di pesce/crostacei nei tre giorni precedenti il prelievo a Taranto;
- consumo di pesce/crostacei nei tre giorni precedenti il prelievo con consumo di pesce per Amiata, Viterbo e Taranto (con p=0,08), ma non a Gela.

In generale, l'analisi di correlazione tra le variabili risultate più informative dalle varie elaborazioni effettuate ha mostrato alcuni risultati statisticamente significativi diversificati da area a area.

Di questo risultato occorre tenere conto nell'interpretazione delle relazioni tra arsenico e variabili che possono giocare un ruolo sinergico tra loro (per esempio, alcuni soggetti che bevono acqua di acquedotto bevono anche acqua di pozzo, altri occupati nell'industria chimica hanno anche consumato prodotti della pesca, e così via).

ANALISI DELLE ASSOCIAZIONI TRA MARCATORI DI DANNO AL DNA E CONCENTRAZIONI DI ARSENICO

Come marcatori di danno al DNA e stress cellulare sono stati considerati la forma fosforilata dell'istone H2AX (γH2AX) e la sintesi

del polimero PAR. Il campione totale relativo alle tre aree (Amiata, Viterbo e Taranto) è costituito da 155 soggetti, di cui 76 maschi e 79 femmine. I dati di Gela non sono disponibili per le motivazioni riportate in dettaglio nell'Allegato 17 (pg. 18) all'interno del quale sono state riportate le attività effettuate nella loro interezza.

Tra le varie analisi di associazione effettuate nell'ambito del progetto SEpiAs (Allegati 24 e 25), particolarmente interessanti si sono rivelati i risultati ottenuti dall'incrocio dei marcatori PAR e γH2AX misurati nei linfociti dei soggetti, con due classi di valori relative all'As urinario: quelli sopra il cut-off di >3,86 µg/l per As_i e quelli >19,3 µg/l per As_i+MMA+DMA (Allegato 24).

In particolare, rispetto all'As_i i valori medi di PAR considerati nell'insieme di tutte le aree sono 39,05 per la classe di soggetti con As_i <3,86 µg/l e 39,40 per i soggetti con As_i ≥3,86 µg/l. I valori medi di γH2AX considerati nell'insieme di tutte le aree sono 35,32 per la classe di soggetti con As_i <3,86 µg/l e 36,35 per i soggetti con As_i ≥3,86 µg/l. I risultati derivanti dalle analisi, sia univariate sia multilinare, hanno mostrato una tendenza all'aumento dei due marcatori di esposizione in corrispondenza di valori elevati di As_i. L'osservazione che i soggetti con As_i sopra il cut-off presentano va-

lori di PAR e γ H2AX più alti si riferisce a tutte le aree e risulta valida sia nei maschi sia nelle femmine. Questo risultato emerge in numerose aree per diventare sostanzialmente generalizzato se si confrontano i limiti superiori della media geometrica. Infatti, i valori relativi al limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% per PAR risultano 40,91 e 43,37 riferiti rispettivamente ai soggetti con $As_i < 3,86$ e $\geq 3,86$ $\mu\text{g/l}$, mentre quelli di γ H2AX sono 37,06 per la classe di soggetti con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ e 40,05 per i soggetti con $As_i \geq 3,86$ $\mu\text{g/l}$. La mancanza dei dati relativi all'area di Gela incide sull'ampiezza del campione; sarebbe quindi molto utile poter completare lo studio sui soggetti residenti in quell'area. Globalmente, i risultati relativi all'associazione tra marcatori di danno e concentrazioni urinarie di arsenico, anche se non statisticamente significativi, offrono spunti per approfondimenti futuri, volti a comprendere se i parametri considerati possano essere predittivi di esposizione ad arsenico.

Molto promettenti si sono rivelati i risultati degli studi di associazione dei marcatori PAR e γ H2AX con i polimorfismi genetici dei geni coinvolti nel metabolismo dell'arsenico AS3MT, GST-T, GST-M, HOGG1 e XRCC1 (Allegato 24). Sono state considerate due classi di concentrazione di As_i ($< 3,86$ $\mu\text{g/l}$ e $\geq 3,86$ $\mu\text{g/l}$) e di $As_i + \text{MMA} + \text{DMA}$ ($< 19,3$ $\mu\text{g/l}$ e $\geq 19,3$ $\mu\text{g/l}$). Le altre due variabili considerate sono la presenza o l'assenza di polimorfismo genetico per ogni gene analizzato. Il dettaglio dei risultati è descritto nell'Allegato 24, mentre un riepilogo è riportato in **tabella 25**, dove sono visualizzati tramite frecce (verso l'alto o il basso) gli andamenti (incremento o decremento) dell'associazione dei due marcatori con i vari polimorfismi e con la concentrazione di As_i . L'ultima colonna riporta anche il valore di significatività dei dati. Di seguito vengono commentati i risultati significativi:

■ il marcatore PAR risulta generalmente aumentato nella popolazione femminile rispetto al polimorfismo GST-T, confrontando sia l'allele mutato con il *wild-type* (in particolare nei soggetti con $As_i \geq 3,86$ $\mu\text{g/l}$) sia la concentrazione di As_i ; al contrario, per il polimorfismo GST-M si osserva una diminuzione

di PAR nei soggetti con mutazione rispetto al *wild-type* con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$, in particolare in tutta la popolazione proveniente dalla zona dell'Amiata (specialmente quella femminile) e nei maschi di Taranto;

■ il marcatore γ H2AX associato al polimorfismo GST-T aumenta nella popolazione maschile di Taranto relativamente all'allele con mutazione e $As_i \geq 3,86$ $\mu\text{g/l}$ rispetto al mutato con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$; confrontato con GST-M, γ H2AX è aumentato nei campioni con l'allele mutato rispetto al *wild-type* con $As_i < 3,86$ nella popolazione maschile in ogni area e in particolare in quella di Viterbo; al contrario, per la popolazione femminile dell'Amiata l'analisi indica che γ H2AX diminuisce nei soggetti con mutazione e $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ rispetto al *wild-type*.

Il confronto di γ H2AX con il polimorfismo AS3MT nel campione femminile di Taranto mostra una diminuzione, nei soggetti con mutazione, indipendente dai livelli di As_i . Con il gene XRCC1 si osserva una sua diminuzione nella popolazione totale di Viterbo (in particolare in quella maschile), relativamente al *wild-type* con $As_i \geq 3,86$ in relazione al *wild-type* con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$; una diminuzione si osserva anche nella popolazione totale di Taranto, osservando l'allele mutato e il *wild-type* con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$.

L'analisi di γ H2AX in associazione con il polimorfismo HOGG1 rivela una diminuzione nei campioni con allele mutato e $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ rispetto al *wild-type* in tutta la popolazione della zona di Taranto, in particolar modo nei maschi.

Globalmente, questi dati, che possono apparire eterogenei, necessitano di ulteriori approfondimenti e di uno studio accurato dei processi di danno e riparazione del DNA indotti da arsenico.

ANALISI DELLE ASSOCIAZIONI TRA IMT E CONCENTRAZIONI DI ARSENICO

Il campione totale relativo alle quattro aree è costituito da 226 soggetti, di cui 109 maschi e 117 femmine. Le attività effettuate dalla UO8 sono riportate nella loro interezza nell'Allegato 18. Nessuno dei soggetti presi in esame presentava IMT al di sopra

Tabella 25. Riassunto dei risultati statisticamente significativi ($p < 0,11$) rispetto all'associazione tra PAR e γ H2AX, concentrazione di As_i e polimorfismi genetici.

Table 25. Summary of statistically significant results ($p < 0,11$) respect to the association among PAR and γ H2AX, iAs concentration and genetic polymorphisms.

Marcatore	Polimorfismo	Area	Sesso	Risultato	p
PAR	GST-T	Tutte	F	↑ nel mutato con $As_i \geq 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i \geq 3,86$ $\mu\text{g/l}$ ↑ nel mutato con $As_i \geq 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs mutato con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$	0,084 0,100
		Amiata	M+F	↓ nel mutato con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$	0,033
	Taranto	F M	↓ nel mutato con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ ↓ nel mutato con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$	0,061 0,057	
γ H2AX	GST-T	Taranto	M	↑ nel mutato con $As_i \geq 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs mutato con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/L}$	0,051
		Tutte	M	↑ nel mutato con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$	0,066
	GST-M	Amiata	F	↓ nel mutato con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$	0,042
		Viterbo	M	↑ nel mutato con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$	0,060
	AS3MT	Taranto	F	↓ nel mutato con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$	0,046
				↓ nel mutato con $As_i \geq 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i \geq 3,86$ $\mu\text{g/l}$	0,080
	HOGG1	Taranto	M+F	↓ nel mutato con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$	0,013
M			↓ nel mutato con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$	0,044	
XRCC1	Viterbo	M+F	↓ nel wt con $As_i \geq 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$	0,039	
		M	↓ nel wt con $As_i \geq 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$	0,087	
	Taranto	M+F	↓ nel mutato con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$ vs wt con $As_i < 3,86$ $\mu\text{g/l}$	0,087	

wt = wild type

del valore comunemente assunto come patologico (0,9 mm).⁵⁶ Per la popolazione maschile, l'analisi indica come i soggetti studiati presentino un'accentuata propensione all'invecchiamento (coefficiente angolare 6,25 vs 5,20 µm/anno) rispetto alla popolazione sana di riferimento.⁷⁴ Riguardo alla popolazione femminile, la popolazione studiata e quella di riferimento presentano invecchiamenti simili (coefficiente angolare 5,05 vs 4,97 µm/anno). Questi risultati potrebbero indicare che già in giovane età l'effetto dell'esposizione comporta un aumento del fisiologico tasso di crescita annuo dell'IMT. Tale aumento potrebbe portare al raggiungimento di valori rappresentativi di un aumentato fattore di rischio a età precoci rispetto a popolazioni non esposte. Analizzando la situazione dei risultati ottenuti sulle singole aree, particolare attenzione richiede l'analisi dei dati relativi a Gela, dove tutta la popolazione (in particolare quella maschile) presenta tassi di crescita annua di IMT molto più elevati rispetto ai valori di riferimento (coefficiente angolare 8,03 vs 5,20 µm/anno per gli uomini e 5,97 vs 4,97 µm/anno per le donne). Tali dati potrebbero indicare una particolare sensibilità dell'IMT alla tipologia di inquinanti presenti nel territorio di Gela. Le analisi di IMT in funzione dei livelli di esposizione ad arsenico sono state eseguite su un campione di 211 soggetti (di cui 99 maschi). A confronto con la popolazione sana di riferimento, 10 soggetti si situavano oltre 1,96 deviazioni standard della media per età:

questo gruppo non differiva dagli altri per livelli di arsenico o indici di metilazione. Non si sono evidenziate correlazioni significative fra IMT e i parametri sopra citati, considerando come cut-off la mediana.

Sempre premettendo che i valori di IMT sono tutti in un range di valori compresi tra 0,49 e 0,58 (tipici della popolazione giovane-adulta) da tutte le analisi effettuate (tabella 26 e grafico 7) emergono alcuni elementi degni di segnalazione. In particolare si osserva che:

- i valori di IMT nella classe di As più alto crescono nei M+F e nei maschi, e sono simili nelle femmine sul totale delle quattro aree e su ciascuna area, fatta eccezione per l'Amiata dove il valore nei M e M+F è superiore nella classe di As più bassa;
- lo scostamento maggiore tra valori medi di IMT si osserva per i maschi a Taranto e a Gela, dove si osserva il valore medio di classe più elevato;
- sul totale delle quattro aree e dei due sessi si osserva uno scostamento ai limiti della significatività statistica, dopo aggiustamento per i cofattori, che risulta dipendere più dal contributo osservabile nei soli maschi nei quali tuttavia l'aggiustamento produce una perdita di significatività statistica rispetto allo scostamento tra valori grezzi;
- nelle aree l'aggiustamento porta sempre a risultati meno significativi quando si analizzano congiuntamente i due sessi e i ma-

Area	Sesso	Asi	n	IMT medio	IC95% inferiore	IC95% superiore	Differenza grezza	IC95% inferiore	IC95% superiore	p	Differenza aggiustata	IC95% inferiore	IC95% superiore	p
Tutte	M+F	<3,86	156	0,52	0,50	0,53	0,02	-0,01	0,05	0,12	0,02	0,00	0,04	0,07
	M+F	≥3,86	55	0,54	0,51	0,56								
	M	<3,86	67	0,53	0,51	0,55	0,04	0,00	0,08	0,05	0,03	-0,01	0,06	0,15
	M	≥3,86	32	0,57	0,54	0,60								
	F	<3,86	89	0,51	0,49	0,52	-0,01	-0,05	0,02	0,00	0,45	-0,03	0,04	0,85
	F	≥3,86	23	0,49	0,46	0,52								
Amiata	M+F	<3,86	26	0,55	0,52	0,58	-0,04	-0,12	0,04	0,36	-0,04	-0,15	0,07	0,41
	M+F	≥3,86	3	0,51	0,44	0,59								
	M	<3,86	10	0,55	0,49	0,60	-0,03	-0,15	0,08	0,53
	M	≥3,86	3	0,51	0,41	0,61								
	F	<3,86	16	0,55	0,52	0,58
	F	≥3,86	0	0,55	0,52	0,58								
Viterbo	M+F	<3,86	54	0,51	0,49	0,53	0,04	-0,02	0,10	0,16	0,02	-0,02	0,07	0,32
	M+F	≥3,86	8	0,55	0,50	0,61								
	M	<3,86	22	0,53	0,50	0,57	0,04	-0,03	0,10	0,24	0,03	-0,03	0,08	0,28
	M	≥3,86	6	0,57	0,51	0,63								
	F	<3,86	32	0,50	0,47	0,52	-0,01	-0,12	0,11	0,91	-0,04	-0,15	0,07	0,48
	F	≥3,86	2	0,49	0,38	0,60								
Taranto	M+F	<3,86	28	0,50	0,47	0,52	0,03	-0,02	0,07	0,26	0,03	-0,02	0,07	0,29
	M+F	≥3,86	12	0,52	0,49	0,56								
	M	<3,86	12	0,50	0,45	0,54	0,05	-0,03	0,12	0,25	0,03	-0,06	0,11	0,43
	M	≥3,86	5	0,54	0,47	0,61								
	F	<3,86	16	0,50	0,47	0,53	0,01	-0,05	0,07	0,68	0,01	-0,10	0,12	0,84
	F	≥3,86	7	0,51	0,46	0,56								
Gela	M+F	<3,86	48	0,51	0,48	0,54	0,03	-0,02	0,07	0,26	0,02	-0,02	0,06	0,31
	M+F	≥3,86	32	0,54	0,50	0,58								
	M	<3,86	23	0,53	0,48	0,58	0,05	-0,02	0,12	0,16	0,04	-0,03	0,11	0,28
	M	≥3,86	18	0,58	0,53	0,64								
	F	<3,86	25	0,50	0,46	0,53	-0,01	-0,07	0,04	0,68	0,04	-0,03	0,11	0,28
	F	≥3,86	14	0,49	0,44	0,53								

Tabella 26. Analisi delle associazioni tra IMT e concentrazioni di As_i.

Table 26. Analyses of the associations between IMT and iAs concentrations.

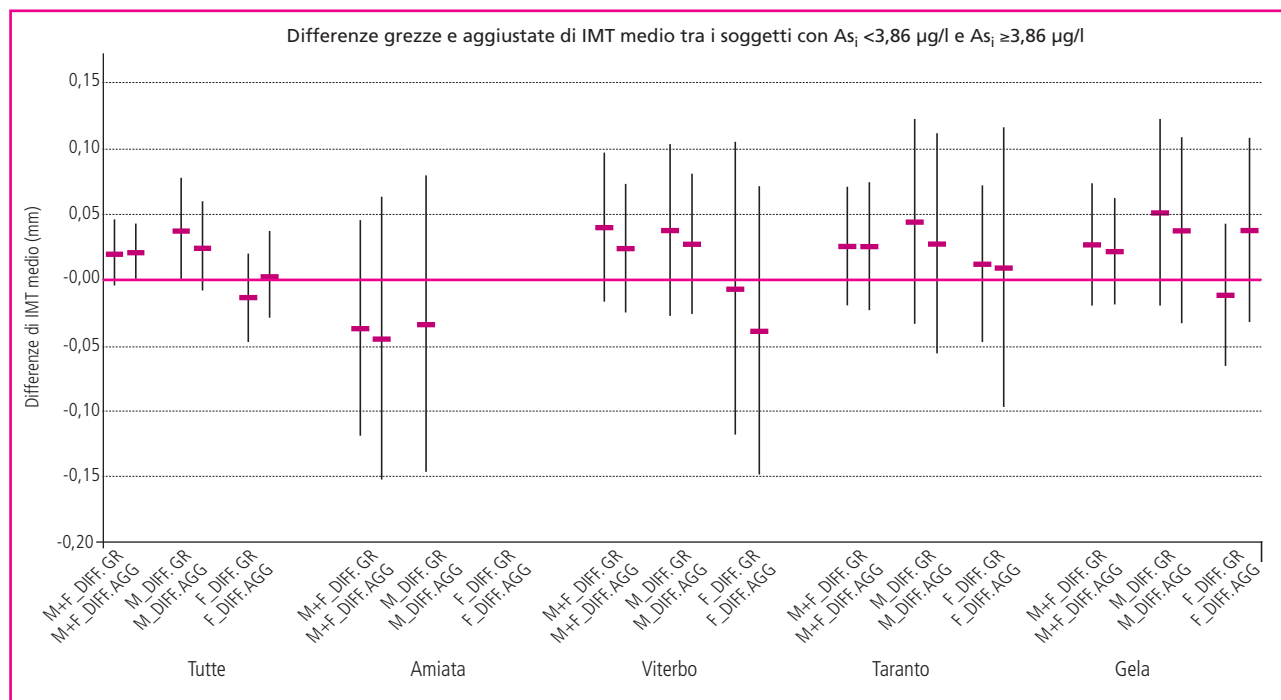


Grafico 7. Differenze aggiustate di IMT medio tra i soggetti con $As_I < 3,86 \mu\text{g/l}$ e $As_I \geq 3,86 \mu\text{g/l}$.
Chart 7. Adjusted differences of mean IMT among subjects with $iAs < 3,86 \mu\text{g/l}$ and $iAs \geq 3,86 \mu\text{g/l}$.

schi, mentre per le femmine di Viterbo e Gela la probabilità al test diminuisce;

■ le differenze tra aree, seppure lievi, sono una traccia di possibile approfondimento sia ampliando il numero di soggetti sia studiando soggetti di età più avanzata.

Per quanto riguarda l'interazione gene-esposizione (Allegato 26), effettuata su un totale di 209 soggetti (di cui 98 maschi), il dato più interessante riguarda l'interazione con il polimorfismo dell'enzima della riparazione hOGG1 (Ser326Cys) del DNA. I mutati con maggiore esposizione ad As_I presentano significativi valori elevati di ispessimento carotideo, anche in assenza di un incremento patologico dell'IMT, nella popolazione generale (da 0,51 a 0,58; $p=0,002$) e, in particolare, nella zone di Gela (da 0,49

a 0,59; $p=0,013$), Viterbo (da 0,53 a 0,61; $p=0,064$) e Taranto (da 0,49 a 0,56; $p=0,071$).

I risultati suggeriscono che la capacità di riparazione della cellula può essere saturata da uno stress ossidativo cronico e influenzata dalle caratteristiche genetiche dell'individuo e dalla loro possibile interazione con l'esposizione.⁷⁸ Questo dato è in linea con precedenti studi⁷⁹ in cui è stato osservato che livelli alti di escrezione urinaria di arsenico e il genotipo Cys-Cys correlavano significativamente con il rischio di sviluppare ipertensione (OR=3,4; IC 95%: 1,1-10,7).

Per quanto riguarda l'interazione gene-esposizione, considerando il polimorfismo XRCC1-399 non si evidenziano risultati significativi.

Capitolo 4

Considerazioni finali

Final considerations

LIVELLI DI ARSENICO NEI CAMPIONI SEPIAS

La distribuzione dell'**arsenico nei campioni biologici** mostra un'elevata variabilità all'interno delle aree e una marcata eterogeneità tra aree.

La valutazione dei valori medi e di quelli più elevati delle distribuzioni dei quattro campioni mostra similitudini tra i campioni di Gela e Taranto, che risultano spostati verso l'alto, una posizione intermedia del campione viterbese e valori più bassi del campione dell'Amiata. In particolare, nelle aree oggetto di studio l'As_i rappresenta il 21-27% dell'arsenico totale, assumendo i valori inferiori tra le femmine dell'Amiata e quelli superiori tra i maschi di Taranto e Gela. L'MMA assume valori proporzionalmente superiori nei campioni dell'Amiata, mentre il DMA presenta percentuali più simili nei diversi campioni (range: 50,5%-57,8%).

Tali dati rafforzano l'immagine di profili diversificati tra aree, con la maggiore distanza tra Amiata e Gela, similitudini tra maschi e femmine nei campioni dell'Amiata e di Viterbo e differenze tra sessi a Gela e a Taranto, dove tra i maschi l'As_i ha maggior peso, e le altre forme sono diversamente rappresentate.

Dal confronto con altri dati, emerge che:

- i risultati ottenuti sull'Amiata per quanto attiene l'As totale sono in linea con quanto misurato in un precedente studio di biomonitoraggio effettuato in quattro Comuni dell'Amiata, tra cui quello di Abbadia San Salvatore, dalla ASL 7 Senese e ARPA Toscana in collaborazione con l'Istituto superiore di sanità;⁸⁰

- i risultati relativi all'As_i ottenuti nel Viterbese sono concordanti come media e superiori come valori più elevati rispetto a quelli ottenuti da Cubadda et al.; considerando la somma di As_i+MMA+DMA i valori medi e i valori più elevati del campione SEpiAs sono risultati inferiori a quelli osservati da Cubadda (va sottolineato che lo studio di Cubadda e collaboratori ha considerato un'area più vasta della provincia di Viterbo,⁷⁷ mentre SEpiAs ha reclutato soggetti solo in due dei Comuni, Ronciglione e Civita Castellana, con livelli particolarmente elevati di As nelle acque per uso civile);

- i risultati del campione di Taranto riferiti all'As totale sono più elevati di quelli precedentemente ottenuti da uno studio su 49 lavoratori di fonderia confrontati con 50 soggetti della popolazione per i quali non erano state segnalate anomalie;⁸¹

- i risultati conseguiti a Gela sono in accordo con quelli del biomonitoraggio umano (BMU) precedentemente effettuato nell'ambito dello studio Sebiomag, che aveva indagato numerosi elementi in traccia e composti organici identificando valori anomali di arsenico totale in oltre il 20% del campione studiato.⁴ Si ricorda che proprio a seguito del reperimento di questi risultati era stato deciso di effettuare un approfondimento tramite speciazione, tant'è che

numerosi dei soggetti studiati da Sebiomag sono rientrati nel campione di SEpiAs; al proposito è prevista un'analisi per dati appaiati sugli stessi soggetti indagati in precedenza da Sebiomag e successivamente da SEpiAs.

L'analisi congiunta degli **indici di efficienza di metilazione** rivela una buona efficienza di metilazione primaria nel campione dell'Amiata compensata da una peggiore efficienza secondaria, testimoniata dal valore più basso del rapporto DMA/MMA. Un profilo opposto si osserva per gli uomini di Gela, caratterizzati da una elevata presenza di As_i, da una elevata efficienza secondaria, mentre l'efficienza totale risulta modesta. In contrasto, per le donne di Gela si osserva una buona efficienza primaria e una bassa efficienza secondaria e totale. Il campione di Viterbo è invece caratterizzato da valori intermedi di efficienza primaria e valori medio-alti di efficienza secondaria e totale.

Se si considera il rapporto tra As(III) e As(V) si osserva che l'As(III) prevale sull'As(V) nei campioni viterbesi e tra le femmine gelesi, confermando la diversità di *pattern* tra aree e tra generi. I risultati supportano l'indicazione all'uso della somma dell'arsenico trivalente e pentavalente come indicatore più stabile di As_i.

Le **analisi esplorative e classiche di associazione** tra fattori di esposizione e concentrazioni di arsenico, tenuto conto di fattori di confondimento e di modificazione di effetto, hanno messo in luce che per quanto riguarda l'uso di acqua è da segnalare l'associazione inversa emersa tra As_i e consumo di acqua imbottigliata per i soggetti dell'Amiata e di Viterbo e l'associazione diretta con l'uso di acqua di acquedotto per bere e cucinare da parte dei soggetti di Viterbo. Per quanto concerne l'esposizione lavorativa, appaiono rilevanti le indicazioni emerse per gli uomini dei campioni di Taranto e Gela che hanno mostrato eccessi del valore medio di As_i in associazione a diverse esposizioni occupazionali autodichiarate con silice o lana di vetro, asbesto, derivati del petrolio, prodotti chimici. Per le donne dei campioni di Viterbo e Taranto emerge un segnale se si considera l'esposizione a solventi organici, tinture, acidi, sebbene sostenuto da pochi casi.

Nel caso della **dieta**, occorre considerare che il consumo su base settimanale include livelli da bassi a elevati di consumo e che l'informazione sul consumo di prodotti locali rappresenta una voce esposta a forte soggettività. Tuttavia alcuni risultati sono ritenuti degni di attenzione soprattutto quando in linea con le conoscenze disponibili. Indicazioni di interesse per l'associazione con livelli medi di As_i emergono per il consumo di latte, in prevalenza intero, sia per le donne sul campione totale e dell'area di Viterbo, sia per l'insieme dei due sessi nei campioni di Taranto e Gela. Il consumo di pesce è risultato associato a maggiori valori di As_i nel campione complessivo e nei campioni di Viterbo e Gela, in particolare tra gli uo-

mini. Altri risultati di potenziale interesse emersi per il consumo di latticini, carne di manzo, di maiale e di agnello nell'Amiata, sono sostenuti da valori medi di As_i bassi rispetto ai riferimenti e/o basati su un numero di soggetti/campioni troppo piccolo per consentire speculazioni. I risultati significativi ottenuti per il consumo di pollo e di cavallo a Taranto e di vino a Gela, invece, forniscono indicazioni per ulteriori approfondimenti. La valutazione dell'informazione sul tipo di produzione «propria o locale» evidenzia risultati di interesse per la verdura fresca che risulta associata a valori medi di As_i più elevati tra i consumatori del campione complessivo delle quattro aree, in particolare tra le femmine, tra le donne del Viterbese e nel campione complessivo di Taranto. Il risultato emerso sul campione complessivo è rafforzato considerando il consumo di frutta fresca. A Taranto si osservano, inoltre, valori medi di As_i più elevati tra i consumatori di pesce di produzione propria/locale. I risultati ottenuti dalle analisi su As_i +MMA+DMA sono sovrapponibili a quelli ottenuti su As_i con le variabili di tipo occupazionale in genere prerogative di Taranto e Gela.

L'analisi di correlazione tra le variabili risultate più informative ha mostrato alcuni risultati statisticamente significativi diversificati tra aree. Tali risultati sono indicativi di interazioni sinergiche al momento non valutate tra variabili emerse come maggiormente associate a un aumento di As_i (per esempio, alcuni soggetti che bevono acqua di acquedotto bevono anche acqua di pozzo, altri occupati nell'industria chimica hanno anche consumato prodotti della pesca, e così via). La valutazione del tipo di sinergismo (additivo, moltiplicativo, altro) richiede analisi specifiche su campioni più numerosi.

SOGGETTI CON VALORI DI ARSENICO SUPERIORI A SOGLIE DI DIVERSO TIPO E SOGGETTI OUTLIER

Il riscontro della presenza nei campioni SEpiAs di soggetti con valori particolarmente elevati di As_i suggerisce un ulteriore controllo di verifica della persistenza o meno delle concentrazioni misurate. Di seguito è presentato e discusso il percorso di definizione dei soggetti con valori elevati e particolarmente elevati, definiti *outlier*.

Come trattato diffusamente nel presente documento, sono stati utilizzati diversi criteri per identificare campioni con valori anomali di arsenico speciato. Gli approcci possibili sono sostanzialmente due:

- il primo tipo, basato sull'uso di soglie di riferimento proposte da società come la SIVR o desumibili dalla letteratura scientifica, è indirizzato alla comparazione rispetto alle soglie prefissate al fine di descrivere e valutare i differenti profili di esposizione tra campione e dati di riferimento e la quota di individui oggetto di indagine che si collocano oltre range per avere una indicazione di impatto dell'esposizione;
- il secondo tipo, che sfrutta indicatori statistici calcolabili sulla stessa distribuzione dei valori misurati nella casistica in studio, è più mirato a identificare soggetti con valori anomali, che danno anch'essi un'immagine di esposizione collettiva ma sono informativi anche a livello individuale.

Per ambedue gli approcci, la scelta di valori soglia più o meno restrittivi comporta l'identificazione di gruppi rispettivamente più ampi o più ridotti di casi con valori anomali, con implicazioni diverse in termini di sanità pubblica (presa in carico degli *outlier*, mi-

sure preventive), di ricerca (approfondimenti o ulteriori studi), di comunicazione pubblica. E' quindi evidente la forte connotazione soggettiva della scelta, che deve essere motivata *a priori* in aderenza agli obiettivi prefissati.

Per il primo tipo (soglie di riferimento) nell'indagine SEpiAs sono stati utilizzati i valori di riferimento suggeriti dalla SIVR (As_i : 0,1-1,5 $\mu\text{g/l}$; As_i +MMA+DMA: 2-15 $\mu\text{g/l}$), più permissivi, e dalla letteratura (valori superiori a 3,86 $\mu\text{g/l}$ per As_i e a 19,3 $\mu\text{g/l}$ per As_i +MMA+DMA), più restrittivi. E' utile sottolineare la maggiore similitudine delle soglie proposte per l' As_i +MMA+DMA rispetto a quelle suggerite per il solo As_i , che comporta un maggiore disallineamento tra valori di riferimento delle due fonti.

Per il secondo tipo (indicatori statistici) sono stati utilizzati il P75, il P90 e il P95 delle distribuzioni nelle quattro aree a scopo descrittivo, e il P95 della distribuzione di tutto il campione per identificare soggetti con valori particolarmente elevati, definiti *outlier*. Nel caso di SEpiAs, utilizzando il valore del P95 della distribuzione generale dell' As_i pari a 25 $\mu\text{g/l}$, si osservano 15 casi *outlier* distribuiti come segue:

- 1 caso >150 $\mu\text{g/l}$ (1 femmina a Taranto);
- 4 casi 100-150 $\mu\text{g/l}$ (2 femmine nel Viterbese, 1 femmina e 1 maschio a Taranto);
- 1 caso 50-100 $\mu\text{g/l}$ (1 femmina a Gela);
- 9 casi 25-50 $\mu\text{g/l}$ (1 maschio nel Viterbese, 1 maschio in Amiata; 3 femmine a Taranto, 2 femmine e 2 maschi a Gela).

Un approfondimento delle principali caratteristiche dei soggetti *outlier* è riportato nella **tabella 27** in riferimento alle variabili più informative.

Dalla tabella analitica dei soggetti *outlier* si ricava che:

- solo 3 casi bevono acqua di acquedotto pubblico;
- una donna del Viterbese usa acqua di pozzo per bere e cucinare;
- dichiarano di bere acqua in bottiglia i 5 soggetti di Gela e 1 dell'Amiata, 4 su 6 a Taranto, 1 su 3 a Viterbo;
- tutti i soggetti cucinano con acqua dell'acquedotto pubblico, ma non quelli di Gela;
- le esposizioni occupazionali sono dichiarate da 9 soggetti e 3 di questi ne dichiarano almeno 2 (1 maschio nel Viterbese, 1 maschio a Taranto, 1 maschio a Gela);
- i consumi dichiarati di prodotti vari di produzione propria/locale caratterizzano il soggetto dell'Amiata e i soggetti di Taranto tranne TF3;
- 6 soggetti su 15 avevano mangiato pesce/crostacei nei tre giorni precedenti il prelievo;
- 5 soggetti hanno l'allele mutato del gene AS3MT (aumento di MMA nelle urine), 6 soggetti hanno GST-T1 *wild-type* (migliore detossificazione e minore suscettibilità a danni al DNA) e 2 di questi hanno entrambe le mutazioni (1 femmina a Taranto con valore molto elevato sia di As_i sia di forme metaboliche, 1 maschio di Taranto con valori più bassi).

Questa tabella è utile per caratterizzare i soggetti singoli e individuare azioni mirate di prevenzione (per esempio, per il caso del soggetto del Viterbese che dichiara di utilizzare acqua di pozzo sia per bere sia per cucinare e per il caso del soggetto dell'Amiata che dichiara di consumare alimenti di produzione propria/locale), per caratterizzare insieme i soggetti con simili caratteristiche nella stessa area e individuare azioni collettive di intervento o di approfondimento

Variabile	Descrizione variabile	VF1	VF2	VM1	AM1	TF1	TF2	TF3	TF4	TM1	TM2	GF1	GF2	GM1	GM2	GF3(N)
Età	classi di età	20-29	30-39	30-39	20-29	20-29	20-29	30-39	30-39	20-29	30-39	20-29	40-44	30-39	40-44	20-29
As _i	As _i (µg/l)	105,6	109,94	26,62	28,50	212,03	103,89	25,41	39,18	135,19	36,85	55,18	28,27	26,93	25,12	27,10
Asi+MMA+DMA	As _i +MMA+DMA (µg/l)	150,06	118,14	39,69	99,81	257,29	155,91	43,31	79,03	162,7	52,70	102,15	116,90	47,07	114,72	61,94
B11.1	beve abitualmente acqua da acquedotto pubblico			•	•				•							
B11.2	beve abitualmente acqua da pozzo privato	•														
B11.3	beve abitualmente acqua imbottigliata		•		•	•	•	•		•		•	•	•	•	•
B12.1	cucina abitualmente con acqua da acquedotto pubblico	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•					•
B12.2	cucina abitualmente con acqua da pozzo privato	•														
D1	è mai stato esposto, nel suo lavoro, a polveri, sostanze chimiche, gas o radiazioni?	•		•			•	•	•	•	•		•	•		
D1a.1	è mai stato esposto, nel suo lavoro, a silice e lana di vetro?			•						•						
D1a.2	è mai stato esposto, nel suo lavoro, ad asbesto o amianto?										•					
D1a.4	è mai stato esposto, nel suo lavoro, a polveri di metallo?							•		•				•		
D1a.5	è mai stato esposto, nel suo lavoro, a derivati del petrolio?									•				•		
D1a.7	è mai stato esposto, nel suo lavoro, a solventi organici, tinture o acidi?	•		•			•		•	•						
H1.a	consuma almeno 2 volte a settimana latte intero					•	•			•						•
H1.o	consuma almeno 2 volte a settimana pesce	•	•	•		•		•	•	•	•			•	•	•
H1.aP	consuma almeno 2 volte a settimana latte intero P/L				•											
H1.fP	consuma almeno 2 volte a settimana mozzarella P/L				•	•	•			•						
H1.gP	consuma almeno 2 volte a settimana burro P/L				•											
H1.kP	consuma almeno 2 volte a settimana agnello P/L				•											
H1.jP	consuma almeno 2 volte a settimana maiale P/L				•											
H1.mP	consuma almeno 2 volte a settimana prod. a base di maiale P/L				•											
H1.oP	consuma almeno 2 volte a settimana pesce P/L					•	•		•	•	•					
H1.rP	consuma almeno 2 volte a settimana verdure P/L	•			•	•	•		•	•	•	•			•	•
H1.tP	consuma almeno 2 volte a settimana frutta P/L				•	•			•	•	•			•	•	
L3-L4	ha consumato pesci-molluschi-crostacei nei tre giorni precedenti il prelievo?	•	•	•				•				•	•			
AS3MT	ha l'allele mutato (sia in omozigosi che in eterozigosi)					•		•			•	•				•
GST-T	è portatore del genotipo <i>wildtype</i> del gene GST-T1		•			•	•				•	•	•	•		

(N): Niscemi; P/L: di produzione propria o locale. (N) Niscemi; P/L own or local production.

Poiché riportare i codici effettivi dei vari soggetti potrebbe comportare il recupero di dati sensibili (nome, cognome), ai soggetti sono stati assegnati codici fittizi secondo il seguente criterio: lettera iniziale: iniziale dell'area di appartenenza; seconda lettera: sesso; numero: numero incrementale. Per esempio, VF1 rappresenta la prima femmina di Viterbo.

Since reporting effective codes of subject could lead to the recovery of sensitive data (name, surname), fictitious codes were assigned to subjects according to the following criteria: first letter – first letter of the area; second letter – sex; number – incremental number. For example VF1 corresponds to the first female in Viterbo area.

Tabella 27. Caratteristiche principali dei soggetti emersi come *outlier* utilizzando 25 µg/l di concentrazione dell'As_i come cut-off.

Table 27. Principal characteristics of subjects identified as outliers using iAs=25 µg/l as cut-off.

(per esempio, l'uso di acqua di acquedotto dei soggetti di Viterbo – tre su tre – e all'opposto Gela, in cui nessuno dei soggetti fa uso di acqua di acquedotto; le esposizioni occupazionali a Taranto – 5 su 6; mutazioni in geni candidati distribuite in tutte le aree, prevalentemente nei campioni di Taranto).

Sia per le soglie del primo tipo sia per quelle di secondo tipo, una volta identificati i valori al di sopra della soglia resta il problema dell'attribuzione del significato in termini di esposizione, di effetto biologico, di potenziale impatto sulla salute.

A questo fine sono cruciali le conoscenze disponibili sul piano epidemiologico e tossicologico che, per quanto concerne l'As, sono evolute nel caso delle alte dosi, mentre sono più immature per le basse dosi. In considerazione del fatto che SEpiAs ha investigato aree con concentrazioni ambientali non considerabili elevate sulla base delle conoscenze *a priori*, ed escludendo fenomeni di avvelenamento o di intossicazioni croniche o acute a livello di comunità potenzialmente esposte (senza escludere possibili eventi individuali), la disponibilità di valori soglia per concentrazioni urinarie per le diverse specie di As è un tema aperto.

A questo proposito, mentre è meno utile il livello di 100 µg/l di concentrazione urinaria di As proposto dall'ATSDR, perché valida per il solo As totale,⁸² sembra più interessante la soglia di 35 µg/l per l'As_i+MMA+DMA fornita dalla American Conference of Governmental Industrial Hygienists come indice di effetto biologico (*biological exposure index* - BEI) proposto per esposizioni occupazionali.⁸³ Con molta cautela, di conseguenza, è possibile usare questo valore per posizionare dati di popolazione, come per esempio è stato fatto negli USA, in cui il P95 della distribuzione dell'As_i+MMA+DMA misurato nel NHANES era 18,9 µg/l, quindi ben al di sotto del BEI suggerito dall'ACGIH.⁸³

Va tenuto presente che se il valore di 35 µg/l è considerato come un'esposizione giornaliera approssimata, in termini di µg/kg/giorno esso significa 0,50 µg/kg/giorno (stima per una persona di 70 kg di peso corporeo), valore che si colloca al limite inferiore del range proposto dall'EFSA di 0,3-8 µg/kg p.c./giorno.⁸³ Lo stesso valore di 0,50 µg/l è invece compreso nel range di esposizione europea di 0,13-0,56 µg/kg/giorno come media, 0,37-1,22 µg/kg/die come P95.⁷ Valori invece superiori a 87,19 µg/l (P95 della distribuzione di As_i+MMA+DMA su 271 soggetti del campione SEpiAs) corrispondenti a 1,24 µg/kg/die si collocano molto al di sopra del BEI suggerito dall'ACGIH e anche del range del P95 proposto da EFSA.

L'informazione relativa agli indici biologici di esposizione ha un valore comparativo e non un significato di livello di sicurezza per le esposizioni generali della popolazione, né un significato di soglia di effetto sulla salute.

Nel caso di SEpiAs i soggetti con valori di As_i+MMA+DMA più elevati di 35 µg/l sono risultati numerosi: 46, pari al 17%, più rappresentati tra gli uomini (uomini: n=27, 20,5%; donne: n=19, 13,7%). La distribuzione dei casi è molto eterogenea tra centri, con frequenze più elevate a Gela (29 casi, pari al 31,9%: 35,4% tra gli uomini e 27,9% tra le donne), di poco inferiori a Taranto (10 casi, pari al 20%, con poca differenza tra uomini e donne), in posizione intermedia il Viterbese, con 5 casi pari al 6,9% e inferiori nell'Amiata, con 2 uomini (3,4% del totale).

Il confronto tra i risultati ottenuti utilizzando come valore soglia 25

µg/l per l'As_i e 35 µg/l per l'As_i+MMA+DMA mostra le differenze di profilo del totale del campione e delle quattro aree. Usando la soglia di 35 µg/l, la triplicazione dei casi totali è dovuta soprattutto a Gela (quasi sei volte) e al quasi raddoppio di Taranto. Questo diverso andamento mette in evidenza un ruolo molto più importante delle forme metilate dell'As_i a Gela e Taranto, indicativo di fonti di esposizione probabilmente diverse, rispetto al Viterbese e all'Amiata, con qualche differenziazione anche tra Taranto e Gela. Per comprendere i diversi profili occorrono ulteriori approfondimenti, a iniziare dalle abitudini alimentari che possono essere diverse, in particolare nell'uso di prodotti della pesca, nell'assunzione di cereali, ma anche di latticini, verdura e frutta, oltre all'acqua.

PROTOCOLLO DI PRESA IN CARICO DEI SOGGETTI OUTLIER

Sulla base dei risultati conseguiti e di tutto quanto scritto in precedenza, in accordo con gli operatori delle quattro unità sanitarie coinvolte si suggerisce una procedura di accertamento per soggetti *outlier*, definiti in SEpiAs come campioni con valori di arsenico inorganico più elevati del valore corrispondente al P95 della distribuzione delle misure effettuate sull'intero campione.

A titolo di premessa al seguente protocollo si sottolineano tre elementi essenziali:

- che le indicazioni di approfondimento medico, non essendo specifiche per le sole esposizioni ad arsenico ed essendo in larga parte mutuuate dalle conoscenze sugli effetti di esposizioni acute e croniche ad alte dosi, hanno valore indicativo e procedurale; infatti esse sono tese in prima istanza a escludere effetti e non a fare una vera e propria diagnosi che potrà essere posta a valle delle diverse fasi previste da parte di personale medico definito allo scopo;
- il protocollo è applicabile a *outlier* definiti sulla base di soglie diverse che, come estesamente spiegato in precedenza, portano a numeri e considerazioni diverse tra loro;
- per tarare e limare i punti più delicati del protocollo si suggerisce una prova sul campo, in primo luogo per la gestione dei soggetti singoli in accordo con le regole per la tutela della *privacy* e la comunicazione chiara e trasparente; per il raggiungimento di questo obiettivo si ritiene opportuna l'effettuazione di una formazione adeguata a livello locale rivolta agli operatori dei servizi e ai medici di medicina generale. L'organizzazione degli eventi formativi si avvarrà del materiale del presente rapporto come base, ma dovrà includere elementi di finalizzazione in grado di tenere conto delle caratteristiche locali.

Protocollo di secondo contatto per i soggetti outlier

1. Ripetizione dell'analisi di As_i e delle sue forme metaboliche nelle urine, secondo il protocollo SEpiAs, con ripetizione del questionario e con indicazione di non mangiare pesce nei tre giorni prima della raccolta delle urine;
2. **a:** se il risultato non è confermato, ripetizione dell'analisi e del questionario a distanza di un mese;
 - b:** se il risultato è confermato:
 - il soggetto viene preso in carico mediante un protocollo includente una terza analisi di As_i e delle sue forme metaboliche nelle urine, con le stesse modalità di cui sopra;
 - viene effettuato un accertamento medico anamnestico su segni

e sintomi potenzialmente indicativi di effetti ascrivibili all'esposizione a livelli medio-alti di As_3 (nausea, vomito, dolori addominali, irritazione cutanea, laringite a seguito di pregresse esposizioni acute, modificazioni della pigmentazione, ricoveri per lesioni cutanee, disturbi alla vescica, reni e sistema respiratorio, manifestazioni neurologiche e cardiovascolari, diabete, debolezza muscolare, strie biancastre ungueali, ipercheratosi palmare e plantare); analisi dell'emocromo per escludere anemia, leucopenia, trombocitopenia, eosinofilia;

■ se alcuni dei segni e sintomi e/o parametri ematochimici risultano alterati viene attivata un'ulteriore valutazione clinica supportata da indagini strumentali e di laboratorio (esami del sangue e delle urine di primo livello: emocromo, glicemia, colesterolo totale e HDL, trigliceridi, sodio, potassio, acido urico, creatinina; esame delle urine per microalbuminuria/cratininuria; misura della pressione arteriosa; ecg; ecocolordoppler dei vasi cerebroafferenti per la ricerca di placche aterosclerotiche);

3. in caso di parametri precedenti alterati, viene attivata una presa in carico sanitaria che provvederà a valutazioni ulteriori e, se del caso, a trattamenti.

La fase 1 è espletata dal team di SEpiAs, comprendente la ASL locale, in collaborazione con il medico curante per quanto attiene l'identificazione dei casi e la convocazione del soggetto, con la spiegazione del motivo del nuovo contatto e delle modalità di prelievo e trasporto del campione urinario. La comunicazione avviene sulla base di una scheda con i dati caratterizzanti il soggetto e dati di riferimento, come quelli riportati nella tabella 22 (pg. 67) che includono le principali informazioni ricavate dalle analisi e dal questionario.

La presa in carico del soggetto è di competenza della ASL di pertinenza, che decide in autonomia i servizi da coinvolgere e le modalità operative. Si suggerisce che le analisi di speciazione vengano realizzate dall'Istituto superiore di sanità (ISS) quale struttura centrale tecnico-scientifica accreditata di supporto al servizio sanitario.

Su tutti gli aspetti descritti è suggerita una discussione approfondita, che coinvolga i responsabili locali, riguardo alla comunicazione alle persone e alla comunità.

BIOMARCATORI MOLECOLARI, DI DANNO AL DNA E DI DANNO CARDIOVASCOLARE

Biomarcatori molecolari

I risultati delle analisi condotte sui polimorfismi genetici permettono di confermare l'importanza, già riscontrata in letteratura, del polimorfismo *AS3MT Met287Thr* e dei geni *GST-T1* e *GST-M1*, coinvolti nel processo di biotrasformazione e metabolismo del-

l'arsenico. È stato osservato e confermato, inoltre, un significativo effetto interattivo del polimorfismo dell'enzima *OGG1* nell'induzione di alterazioni vascolari.

L'analisi dei polimorfismi è quindi di fondamentale importanza per la conoscenza dei meccanismi di trasformazione e metabolismo dell' As_3 nell'uomo e per la valutazione dei rischi collegati alla sua esposizione. L'analisi dei dati mostra una correlazione inversa significativa tra la lunghezza dei telomeri e i livelli urinari di As_3 nei campioni di uomini di Taranto e Gela, ai limiti della significatività nei soli campioni maschili della zona di Gela. La relazione tra esposizione ad arsenico e lunghezza telomerica è stata fino a oggi poco indagata; i risultati ottenuti da SEpiAs rafforzano l'ipotesi che l' As_3 possa svolgere un ruolo nei meccanismi molecolari alla base dell'invecchiamento cellulare e della senescenza accelerata.

Biomarcatori di danno al DNA

I risultati sui marcatori di stress cellulare hanno mostrato una tendenza all'aumento in corrispondenza di valori elevati di As_3 . L'osservazione che i soggetti con As_3 sopra il cut-off presentano valori di PAR e γ H2AX più alti si riferisce a tutte le aree e risulta valida sia nei maschi sia nelle femmine. Questo risultato emerge in alcune aree per diventare sostanzialmente generalizzato se si confrontano i limiti superiori dell'intervallo di confidenza della media geometrica.

Tali risultati, anche se non statisticamente significativi, offrono spunti per approfondimenti futuri.

Biomarcatori di danno cardiovascolare

Premettendo che i valori di IMT sono tutti in un range di valori non patologici compresi tra 0,49 e 0,58 (tipici della popolazione giovane-adulta), dalle analisi effettuate emerge una tendenza all'aumento dei valori medi di IMT nei maschi del Viterbese, Taranto e Gela con $As_3 \geq 3,86 \mu\text{g/l}$ rispetto a quelli con $As_3 < 3,86 \mu\text{g/l}$, con scostamento maggiore tra i maschi di Taranto e Gela.

Dato che a Gela, in particolare tra i maschi, si osservano valori più elevati di As_3 e aumenti dei valori di IMT in funzione dell'età estremamente più elevati rispetto ai valori di riferimento (vedi capitolo 3, pg. 73), tale associazione potrebbe indicare una particolare sensibilità dell'IMT alla tipologia di inquinanti, in particolare di tipo occupazionale, presenti nel territorio di Gela. Un'analisi di approfondimento effettuata incrociando la variabile occupazione in industria chimica (D6) con l'IMT, aggiustando per i fattori comunemente riconosciuti in letteratura associati a danno vascolare e per suscettibilità genetica, ha mostrato un aumento statisticamente significativo dell'IMT nei soggetti maschi occupati rispetto ai non occupati.

Capitolo 5

Conclusioni, indicazioni, raccomandazioni

Conclusions, guidelines, recommendations

Per concludere, i valori che emergono dagli studi di biomonitoraggio umano (BMU) dell'As urinario sono informativi:

- per medici e operatori di sanità pubblica, per stabilire se un soggetto è stato esposto a livelli più elevati di quelli trovati in campioni rappresentativi della popolazione;
- per i decisori, per fare scelte basate su dati individuali di esposizione di elevata affidabilità;
- per i ricercatori, al fine di pianificare e condurre studi su esposizione ed effetti sulla salute.

Si ritiene altresì opportuno ripetere che il BMU ha lo scopo principale di valutare lo stato di esposizione di una popolazione indagata attraverso un campione. La gestione dei casi non è l'obiettivo principale del BMU e non esaurisce le funzioni e le finalità, che invece vogliono contribuire:

1. alla caratterizzazione delle comunità esposte: per questo il BMU deve essere ripetuto nel tempo per comprendere gli andamenti dell'esposizione;
2. alla individuazione di aree/gruppi a maggiore esposizione, per i quali attivare uno specifico BMU con frazione di campionamento che può arrivare fino all'inclusione di tutti i componenti del gruppo, in accordo con gli scopi prefissati e con la portata del fenomeno;
3. alla crescita della comprensione delle cause dell'alterata esposizione, che può essere più facile quando le vie di esposizione sono semplificate (arsenico veicolato dall'acqua in cui è monitorato), o più complessa dove esistono fattori di rischio molteplici e interagenti (fattori ambientali, individuali, attività antropiche, dieta) con conseguenti vie di esposizione che possono aver bisogno di approfondimenti dedicati. Nel primo caso saranno necessarie informazioni su alcuni fattori riconosciuti come associati all'arsenico per correggere l'effetto della fonte principale di esposizione (per esempio, abitudini dietetiche nei confronti del consumo di acqua con elevato tenore di arsenico). Nel secondo caso, in cui manca l'identificazione della via principale di esposizione, sarà necessario un maggior numero di informazioni di livello collettivo e individuale.

La verifica dell'impatto delle misure di prevenzione sull'esposizione reale della popolazione (per esempio in seguito a trattamenti delle acque potabili per distribuire acque con concentrazioni di As <10 µg/l), viene effettuata anche al fine di disporre di dati-guida per ulteriori misure quali, per esempio, il controllo dei livelli di As nelle acque utilizzate nella produzione primaria e alimentare. L'ottenimento di valori di concentrazione anomali è insito nell'indagine campionaria su parametri biologici per i quali è conosciuta *a priori* una elevata variabilità.

La gestione di soggetti portatori di valori anomali elevati, pur es-

sendo onerosa e in grado di catalizzare le preoccupazioni dei finanziatori dei progetti, dei volontari coinvolti e delle comunità interessate, è un obbligo sanitario ed etico nei confronti di chi ha partecipato al BMU.

INDICAZIONI

Dai risultati di SEpiAs, inoltre, emerge una serie di indicazioni sulle attività da effettuare in aree con inquinamento da arsenico conosciuto o ipotizzato sulla base di dati ambientali e/o di BMU:

- a. effettuare sempre la somministrazione di un questionario standardizzato ai soggetti reclutati per i dosaggi di As, che deve prestare speciale attenzione alla raccolta di informazioni su consumi di acque per bere, cucinare, lavarsi, innaffiare, sulle abitudini alimentari, sul lavoro svolto e sulle esposizioni occupazionali e incidentali, sulla presenza di fonti di contaminazione ambientale con particolare riferimento a combustione di carburanti fossili, parchi minerari, presenza di discariche di rifiuti industriali e speciali, aree con irrorazione di pesticidi;
- b. effettuare la speciazione dell'As nelle urine, usando l'As_i come marcatore di esposizione a breve termine, l'As_i+MMA+DMA come marcatore di esposizione a breve-medio termine e, dove indicato, la misurazione dell'As totale nelle unghie come misura di esposizione a medio termine;
- c. valutare il contenuto di As delle acque pubbliche, sia di rete sia di pozzi, e di alimenti di produzione locale, ove possibile determinando le specie dell'As;
- d. valutare, ove indicato da studi di primo livello di complessità, l'esposizione alimentare negli stessi soggetti, effettuando la speciazione dell'As negli alimenti consumati (dieta duplicata);
- e. eseguire le analisi di polimorfismi in geni che codificano enzimi coinvolti nei processi di metilazione e di detossificazione dell'As, con priorità a AS3MT e GST-T1, per i quali in SEpiAs è emerso un ruolo significativo;
- f. eseguire valutazioni dei marcatori di rischio cardiovascolare, con riferimento all'ecg per la valutazione del tratto Q-T e all'ecocolordoppler carotideo per la valutazione dello spessore medio intimale (IMT) in gruppi campionari non giovani (o in gruppi riconosciuti a rischio);
- g. produrre stime di rischio mediante studi epidemiologici analitici e procedura di *risk assessment*;
- h. produrre raccomandazioni per la gestione del rischio, in collaborazione con i soggetti partecipanti;
- i. utilizzare i risultati conseguiti e i materiali e metodi messi a punto per la definizione di un sistema di sorveglianza su esposizione e rischio;
- j. definire azioni e misure di prevenzione primaria.

Sulla base dei risultati conseguiti, queste indicazioni generali possono essere specificate per le quattro aree di SEpiAs.

■ Per l'Amiata c'è indicazione per un intervento mirato su pochi soggetti, e a livello di comunità per una prosecuzione della sorveglianza mediante ripetizione periodica di campagne di BMU senza particolari approfondimenti (attività **a, b, c**).

■ Per il Viterbese ci sono indicazioni alla presa in carico di alcuni soggetti, e a livello di comunità per la continuazione del BMU accompagnato da uno studio sulla dieta, adottando il protocollo completo (attività da **a a j**), escludendo in prima istanza approfondimenti sui rischi cardiovascolari.

■ Per Taranto e Gela ci sono indicazioni per la presa in carico di numerosi soggetti, e a livello di comunità per lo svolgimento di una campagna di BMU ad ampio spettro utilizzando il protocollo completo (attività da **a a j**), con particolare attenzione al recupero di informazioni approfondite sul profilo alimentare, residenziale e occupazionale.

MARCATORI SUGGERITI PER LA SORVEGLIANZA AMBIENTE-SALUTE IN AREE CON CARATTERISTICHE SIMILI A QUELLE CONSIDERATE DA SEPIAS

Sulla base dei risultati conseguiti analizzando le concentrazioni di $As_5 + MMA + DMA$ nelle quattro aree, si suggerisce di considerare almeno i marcatori di seguito specificati.

Tra i marcatori molecolari, $AS3MT$ (marcatore di metilazione ossidativa con implicazioni sul livello del metabolita MMA nelle urine) e $GST-T1$ (marcatore di detossificazione con implicazioni sulle concentrazioni urinarie di As_5 e suoi metaboliti).

Sulla base dei risultati ottenuti analizzando il marcatore di rischio cardiovascolare IMT e i vari marcatori genetici, la valutazione del polimorfismo Ser326Cys del gene hOGG1 (associato a una minore attività enzimatica e a una minore capacità di riparazione del danno al DNA) si propone in aree con livelli di As ambientale ele-

vato, nelle quali venga deciso il BMU di soggetti conosciuti, o ipotizzati, come particolarmente esposti, di età oltre i 45 anni. La misura dello spessore medio intinale (IMT), fatta esclusione per un possibile impiego come misura di accompagnamento al BMU in gruppi di età non giovane e riconosciuti esposti, indirizza a ulteriori approfondimenti di ricerca.

La valutazione dell'accorciamento dei telomeri (indicatore dell'età biologica di una cellula sensibile a stress ossidativo da insulti esogeni di vario tipo) ha dato risultati di grande interesse sui campioni di Taranto e Gela, che richiedono ulteriori conferme per quanto attiene il ruolo specifico di esposizioni ad arsenico.

I marcatori di stress cellulare PARP (marcatore di difesa cellulare) e di danno al DNA istone H2AX (marcatore di presenza di rotture) e l'analisi di immunofluorescenza indiretta per l'identificazione di cellule apoptotiche sono da considerare di estremo interesse sul piano della ricerca ma non maturi per un uso a scopo di sorveglianza.

I risultati sui marcatori di esposizione confermano la necessità di procedere a speciazione dell' As , dosando le forme inorganiche, i metaboliti MMA e DMA, e possibilmente anche le altre forme quali arsenobetaina, arsenocolina, dimetilarsinato e ossido di trimetilarsina.

Si ricorda che questi parametri sono stati selezionati perché suggeriti in letteratura da altri studi e quindi il conseguimento di alcuni risultati, sebbene non definitivi, aggiunge comunque nuova evidenza a quella già disponibile; per questo motivo suggeriamo attenzione ad alcuni di questi (quelli che hanno dato risultati più significativi) e non per altri. Chiaramente, ulteriori studi potranno aggiungere o sottrarre forza alle evidenze qui descritte. Quello che in conclusione riteniamo di sottolineare è che in aree così diversamente caratterizzate dal punto di vista ambientale, sociale e culturale, ci sono evidenze sufficienti per raccomandare la costruzione di protocolli.

Capitolo 6

Prodotti e obiettivi raggiunti

Products and objectives achieved

PRESENTAZIONI DEL PROGETTO SEPIAS

Il disegno metodologico del progetto SEpiAs è stato presentato nelle seguenti occasioni:

- al Seminario dell'Associazione italiana di epidemiologia in occasione del Congresso AIE di primavera «New media for new data», del 6 maggio 2013 a Bologna, da Fabrizio Bianchi con la relazione «Arsenico nell'ambiente: quali rischi? SEpiAs (Sorveglianza epidemiologica in aree interessate da inquinamento ambientale da Arsenico di origine naturale o antropica)».

Ai seguenti seminari di IFC-CNR:

- al Seminario della gioventù di IFC – PhD Day 3, l'11 giugno 2013, da Elisa Bustaffa con la relazione «Epidemiologia, genetica ed epigenetica in con inquinamento da metalli»;

- al Seminario del Direttore dell'IFC-CNR intitolato «Ancora sulle radici ambientali delle malattie cardiovascolari» del 12 febbraio 2013, da Francesca Faita con la relazione "Gli effetti epigenetici e genetici dell'esposizione all'arsenico".

- al Seminario «Integrazione dell'esistente ISE/IFC – Metalli pesanti e salute», da Fabrizio Bianchi ed Elisa Bustaffa, il 10 settembre 2013, con la relazione «Epidemiologia dei metalli pesanti in IFC: SEBIOMAG, SEBIOREC, VASARL».

Gli aspetti metodologici delle attività sui marcatori genetici realizzate dalla UO5 (Istituto di fisiologia clinica del CNR) sono stati illustrati in:

- Faita F, Cori L, Bianchi F, Andreassi MG. Review: Arsenic-Induced Genotoxicity and Genetic Susceptibility to Arsenic-Related Pathologies. *Int J Environ Res Public Health* 2013; 10: 1527-46. Gli aspetti metodologici delle analisi eseguite dalla UO6 (Istituto di genetica molecolare del CNR) sono stati illustrati in:

- una tesi sperimentale di Claudia Prestipino per la Laurea magistrale in Biologia sperimentale e applicata di specializzazione «Analisi di marcatori di stress cellulare da arsenico in soggetti residenti nella zona di Taranto», Università degli studi di Pavia, a.a. 2012-2013;

- una presentazione orale al XXV Italian Meeting «ADP-RIBOSYLATION REACTIONS» presso l'IGM-CNR a Pavia il 31 maggio 2013 dal titolo: «Detection of poly(ADP-ribose) in human lymphocytes: a predictive marker of stress?» di Grecchi S, Lisa A, Scovassi AI, Institute of molecular genetics of CNR, Pavia, Italy.

- un poster al Convegno ICHMET 2012, svoltosi a Roma dal 23 al 27 settembre 2012 dal titolo: «Search for cellular stress biomarkers in lymphocytes from individuals exposed to arsenic: a pilot study» di Scovassi AI, Grecchi S, Cori L, Bianchi F.

Gli aspetti metodologici relativi alle attività svolte sul tema «arsenico e rischio cardiovascolare», coordinate dalla UO 8 (Istituto di fisiologia clinica del CNR) sono stati illustrati in:

- Bianchi F, Cori L, Sicari R. Arsenic and cardiovascular diseases,

16th International Conference on Heavy Metals in the Environment, ICHMET, Rome 23-27 September 2012.

- Stea F, Bianchi F, Cori L, Sicari R. Cardiovascular effects of arsenic: clinical and epidemiological findings. *Environ Sci Pollut Res* 2013; DOI 10.1007/s11356-013-2113-z.

COMUNICAZIONE SUL PROGETTO SEPIAS

La comunicazione relativa al progetto è stata ritagliata in modo differenziato, poiché le comunità in ciascuna delle aree ha maturato diverse sensibilità e bisogni.

- Nel caso di Taranto e Gela i giornali locali, che sono in costante contatto con le autorità sanitarie, hanno pubblicato notizie sull'inizio dello studio, facilitando l'adesione di volontari.

- Il Viterbese è un territorio molto sensibile e di recente allarmato a causa dei divieti di utilizzo dell'acqua potabile. Le autorità hanno per questo preferito lasciare ai medici di famiglia il compito di contattare i pazienti selezionati dalle liste della ASL-VT, utilizzando i materiali informativi del progetto.

- Anche nel caso dell'Amiata il contatto è stato tenuto direttamente dalla ASL 7-Siena, utilizzando i materiali informativi del progetto. La comunicazione pubblica dei risultati dello studio avverrà tramite un sito web dedicato in corso di allestimento, il presente supplemento monografico della rivista scientifica *Epidemiologia & Prevenzione*, un evento centrale e quattro conferenze di presentazione nelle aree di studio.

Si prevede inoltre la scrittura di almeno quattro articoli scientifici su riviste internazionali riguardanti i risultati generali e i risultati delle Unità operative 6, 7, 8.

VALUTAZIONE GENERALE, CRITICITÀ GENERALI E SPECIFICHE

Il protocollo di SEpiAs è stato inviato ai Comitati etici di ciascuna delle ASL coinvolte nel progetto, incaricati dell'approvazione. Il protocollo di studio è redatto in accordo alle «Norme di buona pratica clinica» dell'Unione europea e alla «Dichiarazione di Helsinki», costituita da principi etici che forniscono una guida per i medici e per gli altri partecipanti alla ricerca medica che coinvolge soggetti umani. I tempi di approvazione sono stati molto variabili, e l'insediamento stesso delle commissioni è stato in alcuni dei casi un elemento di criticità. In un caso sono state fatte obiezioni di contenuto, alle quali il coordinatore di progetto ha risposto nel merito (in dettaglio nelle relazioni periodiche).

La conservazione dei materiali è stata curata da ciascuna delle UO responsabili garantendo l'anonimato e l'utilizzo esclusivo ai fini del presente studio.

Dal punto di vista dell'andamento generale del progetto, la principale criticità è stata la difficoltà di partecipazione dell'Unità ter-

ritoriale originariamente definita come UO1 ASL Verbano-Cusio-Ossola e ARPA Piemonte, che si è rivelata già nella fase iniziale per motivi di distribuzione della popolazione nell'area e limitata presenza di personale presso la ASL che avrebbe dovuto operare sul territorio. Questa difficoltà ha determinato l'uscita dal progetto, su sua richiesta motivata, della suddetta ASL e la susseguente sostituzione con la ASL di Viterbo e Dipartimento di epidemiologia del Servizio sanitario della Regione Lazio che congiuntamente hanno identificato i Comuni di Civita Castellana e Ronciglione per i campionamenti previsti dal protocollo SEpiAs.

Altre criticità sul piano organizzativo sono state:

- una lunga fase di chiarimenti avvenuta con il (solo) Comitato etico locale della ASL7 Senese, che ha ritardato la partenza dello studio di quasi un anno ed è stata superata con un confronto serrato in prima fase da parte del responsabile locale di SEpiAs, in seconda fase da parte del coordinatore di SEpiAs;
- l'organizzazione del trasporto dei campioni di sangue e urine verso i differenti laboratori previsti dal protocollo; tali difficoltà sono state superate con l'impiego di personale dedicato a seguire tutte le fasi, dall'invio all'arrivo dei campioni.

Dal punto di vista delle analisi incluse nel protocollo SEpiAs sono emerse tre criticità:

- il disegno iniziale prevedeva l'esame dei micronuclei da parte della UO5, un'analisi che richiede il recapito dei campioni di sangue fresco al laboratorio nell'arco di 24 ore; in fase organizzativa sono emerse difficoltà da parte di tutte le UO territoriali e in particolare da parte della UO di Gela;
- la UO di Gela non è riuscita ad avere a disposizione una centrifuga con caratteristiche adeguate alla separazione dei linfociti da sangue periferico per la preparazione dei vetrini, utili all'analisi della proteina H2AX modificata, indicatore di rotture del DNA (UO6); in conseguenza di ciò, la suddetta analisi non è stata eseguita nell'area di Gela;
- l'esecuzione di analisi ematochimiche di routine non è avvenuta in modo uniforme in tutte le aree a causa del diverso impegno dei laboratori e copertura di costi necessari.

Segue un richiamo ai criteri di valutazione specificati nel protocollo e l'analisi nel dettaglio di quanto conseguito.

OBIETTIVO GENERALE

Valutazione della relazione tra esposizione umana ad arsenico, stimata sia attraverso dati ambientali sia mediante indicatori di dose assorbita, e marcatori biologici di effetto precoce sulla salute, allo scopo di definire indicatori per un sistema avanzato di sorveglianza ambiente-salute.

Indicatore/i di risultato

- Trasferimento dei risultati in indicatori per il sistema di sorveglianza ambiente-salute nelle aree a rischio.
- Redazione di un protocollo per la definizione degli indicatori di inquinamento ambientale, di biomarcatori di esposizione e di indicatori di danno precoce alla salute.
- Applicazione del protocollo nelle aree pilota. Redazione di un report delle attività realizzate, entro la conclusione del progetto e sua disponibilità via sito web.

Standard di risultato

- Uso indicatori validati e test di ulteriori mirati ai territori prescelti.
- Realizzazione delle fasi previste (100%).
- Campionatura completa dei soggetti (100%).

Valutazione

Sono stati utilizzati indicatori standard e proposti e usati nuovi indicatori mirati, riportati nel report finale; tutte le fasi sono state realizzate come riportato nel report finale, reso disponibile entro la conclusione del progetto e accessibile via web.

Gli indicatori proposti sono riportati nel report finale; il protocollo di indagine è stato definito, utilizzato, testato, riportato nel report finale, incluso il questionario per le interviste; il protocollo di indagine è stato applicato nelle quattro aree; il report delle attività è stato realizzato a conclusione del progetto.

Sono stati reclutati 271 soggetti a fronte dei 200 previsti, pari al 135% dell'obiettivo.

OBIETTIVO 1

Coordinamento scientifico e organizzativo del progetto (UO di coordinamento).

Indicatore/i di risultato

- Realizzazione di riunioni; attività di rete e accompagnamento via internet.
- Redazione di report e di rendicontazioni tecniche e finanziarie.

Standard di risultato

- Realizzazione di tre riunioni nelle fasi iniziali, intermedia e finale del progetto.
- Redazione di quattro rendicontazioni tecniche e finanziarie.
- Realizzazione di un report con sommario esecutivo.

Valutazione

- Rispetto dei tempi e degli standard qualitativi previsti nel progetto.

- Redazione di un report dedicato all'illustrazione degli indicatori a scopi operativi per i servizi di sanità pubblica.

I risultati attesi sono stati conseguiti. E' stata chiesta una proroga di nove mesi dovuta principalmente a difficoltà di tipo amministrativo-contabile, incontrati soprattutto dalle ASL coinvolte. L'esame e la discussione scientifica dei risultati hanno occupato interamente il periodo di proroga richiesto e proseguiranno, anche in collaborazione con gruppi internazionali impegnati in studi sulla salute di popolazioni esposte ad As.

Sono state realizzate tre riunioni nazionali (iniziale, intermedia, finale) e numerose riunioni in tutte le aree (tre a Viterbo, due in Amiata, due a Taranto, tre a Gela). E' stato preparato un protocollo standard per studi di analogo tipo. Sono state realizzate cinque rendicontazioni tecniche e finanziarie intermedie, oltre il rapporto finale con sommario esecutivo, contenente indicazioni per la sanità pubblica.

OBIETTIVO 2

Raccolta dei dati ambientali e sanitari nelle zone d'interesse, utili

alla caratterizzazione ambiente-salute e alla definizione dei proxi di esposizione (UO1, 2, 3, 4).

Indicatore/i di risultato

■ Accesso e consultazione di documentazione e flussi informativi per il reperimento dei dati rilevanti.

Standard di risultato

- Reperimento dei dati di interesse disponibili nelle quattro aree (100%).
- Stima dell'esposizione delle aree di residenza per almeno il 90% dei soggetti reclutati nelle quattro aree.

Valutazione

I dati ambientali e sanitari prefissati sono stati raccolti nelle quattro aree. L'esposizione è stata definita per tutti i soggetti reclutati.

OBIETTIVO 3

Campionamento (UOC e UO1, 2, 3, 4).

Indicatore/i di risultato

- Recupero dati da anagrafi comunali o da elenchi degli assistiti.
- Reclutamento dei donatori nei tempi previsti.
- Realizzazione delle interviste.
- Prelievo dei campioni biologici.
- Numero di invii di campioni biologici ai laboratori dalle quattro aree.
- Numero di campioni biologici deteriorati e quindi da ripetere.

Standard di risultato

- Assenso al prelievo e all'intervista da parte dei soggetti campionati/numero campionati (60%).
- Completamento interviste e prelievo/numero assensi (90%).
- Perdita di campioni biologici inferiore al 5%.

Valutazione

I risultati conseguiti sono tutti al di sopra degli obiettivi prefissati. In particolare: soggetti campionati/numero campionati = 83%, variabile da area ad area (71% Amiata, 89% Viterbo, 83% Taranto,

89% Gela), interviste e prelievo/numero assensi >95%, perdita di campioni biologici inferiore all'1% (2 campioni).

OBIETTIVO 4

Analisi di laboratorio e cliniche (UO5, 6, 7, 8).

Indicatore/i di risultato

- Realizzazione delle misurazioni di biomarcatori di esposizione secondo gli standard di laboratorio certificati.
- Congruità dei risultati con i valori di riferimento.

Standard di risultato

- Misurazioni di biomarcatori di esposizione, di suscettibilità di danno cromosomico, di danno epigenetico, di rischio clinico in almeno 180 campioni e almeno 40 in ciascun centro.
- Misurazioni di marcatori di danno al DNA, stress e apoptosi in almeno 160 campioni e almeno 30 in ciascun centro.

Valutazione

Il risultato è stato ampiamente conseguito avendo dosato biomarcatori di esposizione, suscettibilità, effetto, rischio, in 269 campioni complessivi e non meno di 50 in un'area.

OBIETTIVO 5

Valutazione e integrazione dei risultati, definizione di indicatori (UOC in collaborazione con tutte le UO).

Indicatore/i di risultato

- Analisi statistica dei dati per valutazioni univariate, multivariate, di correlazione tra indicatori.
- Definizione degli indicatori sulla base dei dati reperiti integrati con quelli della letteratura internazionale.

Standard di risultato

Redazione di un report dedicato all'illustrazione degli indicatori che includa la metodologia e le indicazioni operative.

Valutazione

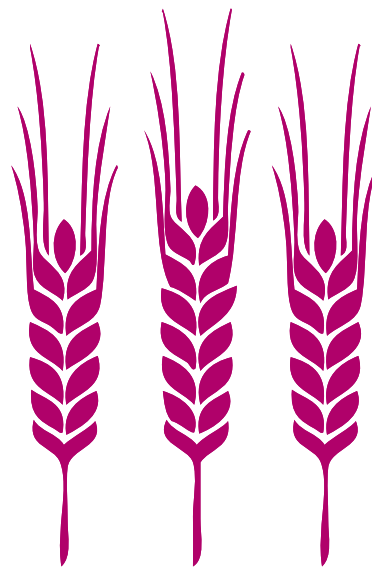
Tutte le analisi uni-bi-multi-variate preventivate sono state eseguite e i risultati sono stati sottoposti a confronti interni e esterni.

Bibliografia References

1. Straif K, Benbrahim-Tallaa L, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Guha N, Freeman C, Galichet L, Cogliano V; WHO International Agency for Research on Cancer Working Group. A review on human carcinogens – part C: metals, arsenic, dusts, and fibres. *Lancet Oncol* 2009; 19(5): 453-54.
2. IARC (2012). Arsenic and arsenic compounds. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum; 100C: 41-93.
3. WHO (2011) Guidelines for Drinking-water Quality 4th edition. Available at www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_chapters/en/
4. Bianchi F, Minoia C, Minichilli F, Cori L, Bustaffa E, Leoni E, Migliore S, Ronchi A, Turci R. Biomonitoring studies: bioaccumulation of PCBs and heavy metals, in Human health in areas with local industrial contamination. Care of Mudu P, Martuzzi M and Terracini B. WHO Copenhagen, in press 2013.
5. WHO 2001. Environmental Health Criteria 224: Arsenic and arsenic compounds. World Health Organization, Geneva.
6. US EPA 2003. A Review of the Reference Dose and Reference Concentration Processes. US EPA/630/P-02/002F, 2002. Risk Assessment Forum, Washington, DC, 192 pp. <http://cfpub.epa.gov/ncea/raf/>
7. EFSA 2009. Scientific Opinion on Arsenic in Food; EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA Journal*; 7 (10): 1351.
8. EPA – Arsenic in drinking water- Available at <http://water.epa.gov/lawsregs/rulesregs/sdwa/arsenic/index.cfm>
9. Direttiva 98/83/CE del Consiglio del 3 novembre 1998 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano.
10. SCHER 2010. Derogation on the Drinking Water Directive 98/83/EC. 11.
11. Mandal BK, Ogra Y, Suzuki KT. Identification of dimethylarsinous and monomethylarsonous acids in human urine of the arsenic-affected areas in West Bengal, India. *Chem Res Toxicol Appl* 2001; 14(4): 371-378.
12. Sumi D, Himeno S. Role of arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase in arsenic metabolism and toxicity. *Biol Pharm Bull* 2012; 35(11): 1870-1875.13.
13. Watanabe T, Hirano S. Metabolism of arsenic and its toxicological relevance. *Arch Toxicol* 2013; 87(6): 969-979.
14. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 2011; 283(2-3): 65-87.
15. Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, Baros S, Liska J, Hudecova D, Rhodes CJ, Valko M. Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol* 2011; 31(2): 95-107.
16. Rodriguez RR, Basta NT, Casteel SW, Armstrong FP, Ward DC. Chemical extraction methods to assess bioavailable arsenic in soil and solid media. *J Environ Qual* 2003; 32(3): 876-84.
17. Liu CW, Liang CP, Huang FM, Hsueh YM. Assessing the human health risks from exposure of inorganic arsenic through oyster (*Crassostrea gigas*) consumption in Taiwan. *Sci Total Environ*. 2006; 361: 57-66.
18. Loffredo CA. Variability in human metabolism of arsenic. *Environ Res* 2008; 92: 85-91.
19. Valenzuela OL, Germolec DR, Borja-Aburto VH, Contreras-Ruiz J, García-Vargas GG, Del Razo LM. Chronic arsenic exposure increases TGF α concentration in bladder urothelial cells of Mexican populations environmentally exposed to inorganic arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 222(3): 264-70.
20. Agusa T, Fujihara J, Takeshita H, Iwata H. Individual Variations in Inorganic Arsenic Metabolism Associated with AS3MT Genetic Polymorphisms. *Int J Mol Sci* 2011; 12(4): 2351-2382.
21. Gomez-Rubio P, Roberge J, Arendell L, Harris RB, O'Rourke MK, Chen Z, Cantu-Soto E, Meza-Montenegro MM, Billheimer D, Lu Z, Klimecki WT. Association between body mass index and arsenic methylation efficiency in adult women from southwest U.S. and northwest Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011; 252(2): 176-82.
22. Gamble MV, Liu X, Slavkovich V, Pilsner JR, Ilievski V, Factor-Litvak P, Levy D, Alam S, Islam M, Parvez F, Ahsan H, Graziano JH. Folic acid supplementation lowers blood arsenic. *Am J Clin Nutr* 2007; 86(4): 1202-1209.
23. Raml RW, Goessler W, Francesconi KA. Improved chromatographic separation of thio-arsenic compounds by reversed-phase high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2006; 1128: 164-170.
24. Raber G, Raml R, Goessler W, Francesconi KA. Quantitative speciation of arsenic compounds when using organic solvent gradients in HPLC-ICPMS. *J Anal At Spectrom* 2010; 25: 570-576.
25. Gruber JF, Karagas MR, Gilbert-Diamond D, Bagley PJ, Zens MS, Sayarath V, Punshon T, Morris JS, Cottingham KL. Associations between toenail arsenic concentration and dietary factors in a New Hampshire population. *Nutr J* 2012; 11: 45.
26. Lambrou A, Baccarelli A, Wright RO, Weisskopf M, Bollati V, Amarasinghwarana C, Vokonas P, Schwartz J. Arsenic exposure and DNA methylation among elderly men. *Epidemiology* 2012; 23(5): 668-76.
27. Pierce BL, Kibriya MG, Tong L, Jasmine F, Argos M, Roy S, Paul-Brutus R, Rahaman R, Rakibuz-Zaman M, Parvez F, Ahmed A, Quasem I, Hore SK, Alam S, Islam T, Slavkovich V, Gamble MV, Yunus M, Rahman M, Baron JA, Graziano JH, Ahsan H. Genome-wide association study identifies chromosome 10q24.32 variants associated with arsenic metabolism and toxicity phenotypes in Bangladesh. *PLoS Genet* 2012; 8(2): e1002522.
28. Martinez VD, Vucic EA, Adonis M, Gil L; Lam W.L. Arsenic biotransformation as a cancer promoting factor by inducing DNA damage and disruption of repair mechanisms. *Mol Biol Int* 2011; 2011, 718974.
29. Li JH, Rossman TG. Comutagenesis of sodium arsenite with ultraviolet radiation in Chinese hamster V79 cells. *Biol Met* 1991; 4(4): 197-200.
30. Kessel M, Liu SX, Xu A, Santella R, Hei TK. Arsenic induces oxidative DNA damage in mammalian cells. *Mol Cell Biochem* 2002; 234-235(1-2): 301-308.
31. Chung CJ, Huang CJ, Pu YS, Su CT, Huang YK, Chen YT, Hsueh YM. Polymorphisms in cell cycle regulatory genes, urinary arsenic profile and urothelial carcinoma. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 232(2): 203-9.
32. Huang CY, Su CT, Chung CJ, Pu YS, Chu JS, Yang HY, Wu CC, Hsueh YM. Urinary total arsenic and 8-hydroxydeoxyguanosine are associated with renal cell carcinoma in an area without obvious arsenic exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; 262(3): 349-54.
33. Mahata J, Basu A, Ghoshal S, Sarkar JN, Roy AK, Poddar G, Nandy AK, Banerjee A, Ray K, Natarajan AT, Nilsson R, Giri AK. Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat Res* 2003; 534(1-2): 133-143.
34. Ghosh P, Basu A, Mahata J, Basu S, Sengupta M, Das J, Mukherjee A, Sarkar AK, Mondal L, Ray K, Giri AK. Cytogenetic damage and genetic variants in the individuals susceptible to arsenic-induced cancer through drinking water. *Int J Cancer* 2006; 118(10): 2470-2478.
35. Ghosh P, Banerjee M, De Chaudhuri S, Das JK, Sarma N, Basu, A, Giri AK. Increased chromosome aberration frequencies in the Bowen's patients compared to non-cancerous skin lesions individuals exposed to arsenic. *Mutat Res* 2007; 632(1-2): 104-110.
36. Basu A, Ghosh P, Das JK, Banerjee A, Ray K, Giri AK. Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: a comparative study in three cell types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13(5): 820-827.
37. Martínez V, Creus A, Venegas W, Arroyo A, Beck JP, Gebel TW, Surrallés J, Marcos R. Evaluation of micronucleus induction in a Chilean population environmentally exposed to arsenic. *Mutat Res* 2004; 564(1): 65-74.
38. Liou SH, Chen YH, Loh CH, Yang T, Wu TN, Chen CJ, Hsieh LL. The association

- between frequencies of mitomycin C-induced sister chromatid exchange and cancer risk in arseniasis. *Toxicol Lett* 2002; 129(3): 237-243.
39. Hartwig A, Groblichoff UD, Beyersmann D, Natarajan AT, Filon R, Mullenders LH. Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis* 1997; 18(2): 399-405.
 40. Curnow A, Salter L, Morley N, Gould D. A preliminary investigation of the effects of arsenate on irradiation-induced DNA damage in cultured human lung fibroblasts. *J Toxicol Environ Health A* 2001; 63(8): 605-616.
 41. Andrew AS, Karagas MR, Hamilton JW. Decreased DNA repair gene expression among individuals exposed to arsenic in United States drinking water. *Int J Cancer* 2003; 104(3): 263-268.
 42. Sykora P, Snow ET. Modulation of DNA polymerase beta-dependent base excision repair in cultured human cells after low dose exposure to arsenite. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 228(3): 385-394.
 43. Ebert F, Weiss A, Bültemeyer M, Hamann I, Hartwig A, Schwerdtle T. Arsenicals affect base excision repair by several mechanisms. *Mutat Res* 2011; 715(1-2): 32-41.
 44. Lindberg AL, Kumar R, Goessler W, Thirumaran R, Gurzau E, Koppova K, Rudnai P, Leonardi G, Fletcher T, Vahter M. Metabolism of low-dose inorganic arsenic in a central European population: influence of sex and genetic polymorphism. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 1081-1086.
 45. Wang YH, Wu MM, Homg CT, Lien LM, Hsieh YC, Tseng HP, Chang SF, Su CL, Chiou HY, Chen CJ. Effects of arsenic exposure and genetic polymorphism of p53, glutathione S-transferase M1, T1, and P1 on the risk of carotid atherosclerosis in Taiwan. *Atherosclerosis* 2007; 192: 305-312.
 46. Fujihara J, Soejima M, Yasuda T, Koda Y, Kunito T, Iwata H, Tanabe S, Takeshita H. Polymorphic trait in oxidative damage of arsenic exposed Vietnamese. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 256: 174-178.47.
 47. Jackson SP. Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 2002; 23: 687-696.
 48. Scovassi AI, Denegri M, Donzelli M, Rossi L, Bernardi R, Mandarino A, Frouin I, Negri C. Poly(ADP-ribose) synthesis in cells undergoing apoptosis: an attempt to face death before PARP degradation. *Eur J Histochem* 1998; 42(4): 251-258.
 49. Donà F, Scovassi AI. Poly(ADP-ribose) synthesis: a marker of cellular stress. *Microscopie* 2010; VII: 38-42.
 50. Soldani C, Scovassi AI. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* 2002; 7: 321-328.
 51. Giansanti V, Camboni T, Piscitelli F, Prosperi E, La Regina G, Lazzè MC, Santin G, Silvestri R, Scovassi AI. Study of the effects of a new pyrazolecarboxamide: changes in mitochondria and induction of apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41: 1890-1898.
 52. Giansanti V, Rodriguez GE, Savoldelli M, Gioia R, Forlino A, Mazzini G, Pennati M, Zaffaroni N, Scovassi AI, Torriglia A. Characterization of stress response in human retinal epithelial cells. *J Cell Mol Med* 2013; 17: 103-115.
 53. Parks M, Tillhon M, Donà F, Prosperi E, Scovassi AI. 2-Methoxyestradiol: new perspectives in colon carcinoma treatment. *Mol Cell Endocrinol* 2011; 331(1): 119-128.
 54. Moon K, Guallar E, Navas-Acien A. Arsenic exposure and cardiovascular disease: an updated systematic review. *Curr Atheroscler Rep* 2012; 14(6): 542-55.
 55. States JC, Srivastava S, Chen Y, Barchowsky A. Arsenic and cardiovascular disease. *Toxicol Sci Toxicol Sci* 2009; 107(2): 312-23.
 56. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redón J, Zanchetti A, Böhm M, Christiaens T, Cifkova R, De Backer G, Dominiczak A, Galderisi M, Grobbee DE, Jaarsma T, Kirchhof P, Kjeldsen SE, Laurent S, Manolis AJ, Nilsson PM, Ruilope LM, Schmieder RE, Sirnes PA, Sleight P, Viigimaa M, Waeber B, Zannad F; Task Force Members. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens* 2013; 31(7): 1281-357.
 57. Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007; 115(4): 459-67.
 58. Corciu AI, Siciliano V, Poggianti E, Petersen C, Venneri L, Picano E (2010). Cardiac calcification by transthoracic echocardiography in patients with known or suspected coronary artery disease. *Int J Cardiol*; 142(3): 288-95.
 59. Grecchi S, Mazzini G, Lisa A, Armentero MT, Bergamaschi R, Romani A, Bladini F, Di Perri C, Scovassi AI. Search for Cellular Stress Biomarkers in Lymphocytes from Patients with Multiple Sclerosis: A Pilot Study. *Plos One* 2012; 7: e44935.
 60. Touboul PJ, Hennerici MG, Meairs S, Adams H, Amarenco P, Bornstein N, Csi-ba L, Desvarieux M, Ebrahim S, Hernandez Hernandez R, Jaff M, Kownator S, Naqvi T, Prati P, Rundek T, Sitzer M, Schminke U, Tardif JC, Taylor A, Vicaut E, Woo KS. Mannheim carotid intima-media thickness and plaque consensus (2004-2006-2011). An update on behalf of the advisory board of the 3rd, 4th and 5th watching the risk symposia, at the 13th, 15th and 20th European Stroke Conferences, Mannheim, Germany, 2004, Brussels, Belgium, 2006, and Hamburg, Germany, 2011. *Cerebrovasc Dis* 2012; 34(4): 290-6.
 61. Faita F, Gemignani V, Bianchini E, Giannarelli C, Ghiadoni L, Demi M (2008). Real-time measurement system for evaluation of the carotid intima-media thickness with a robust edge operator. *J Ultrasound Med*; 27(9): 1353-61.
 62. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
 63. StataCorp. 2013. Stata Statistical Software: Release 13. College Station, TX: StataCorp LP.
 64. CDC, Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. 2005. Third Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Available: <http://www.cdc.gov/exposurereport/report.htm>
 65. Hays SM, Aylward LL, Gagné M, Nong A, Krishnan K. Biomonitoring Equivalents for inorganic arsenic. *Reg. Toxicol. Pharmacol* 2010; 58(1): 1-9.
 66. Azzalini A. Inferenza Statistica. Un'introduzione basata sul concetto di verosimiglianza. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 2000.
 67. Hothorn T, Hornik K, Zeileis A. Unbiased Recursive Partitioning: A Conditional Inference Framework. *J Comput Graph Stat* 2006; 15(3): 651-674.
 68. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guidance document on the validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationships [(Q)SAR] models. *ENV/JM/MONO* (2007)2.
 69. Fox J, Weisberg S. An {R} Companion to Applied Regression, 2nd Ed. Sage Publications, Inc. Thousand Oaks, CA; 2011. ISBN: 9781412975148.
 70. Venables WN, Ripley BD. Modern Applied Statistics with S-Plus. Springer (4th Ed.) New York, 2002.
 71. Hall MA. Correlation-based Feature Subset Selection for Machine Learning. Hamilton, New Zealand, 1998.
 72. Hall MA, Frank E, Holmes G, Pfahringer B, Reutemann P, Witten IH. The WEKA Data Mining Software: An Update. *SIGKDD Explorations* 2009; 11(1): 10-18.
 73. Topliss JG, Edwards RP. Chance factors in studies of quantitative structure-activity relationships. *J Med Chem* 1979; 22(10): 1238-1244.
 74. Engelen L, Ferreira I, Stehouwer CD, Boutouyrie P, Laurent S. On behalf of the Reference Values for Arterial Measurements Collaboration. Reference intervals for common carotid intima-media thickness measured with echotracking: relation with risk factors. *Eur Heart J*. 2012. doi:10.1093/eurheartj/ehs380.
 75. Huang YL, Hsueh YM, Huang YK, Yip PK, Yang MH, Chen CJ. Urinary arsenic methylation capability and carotid atherosclerosis risk in subjects living in arsenicosis-hyperendemic areas in southwestern Taiwan. *Sci Total Environ* 2009; 407(8): 2608-14.
 76. Vahter M. Mechanisms of arsenic biotransformation. *Toxicology* 2002; 181-182: 211-217.
 77. Cubadda F, Aureli F, D'Amato M, Raggi A, Turco AC, Mantovani A. Speciated urinary arsenic as a biomarker of dietary exposure to inorganic arsenic in residents living in high-arsenic areas in Latium, Italy. *Pure and applied chemistry*. 2012; 84(2): 203-214.
 78. Simonelli V, Camerini S, Mazzei F, Van Loon B, Allione A, D'Errico M, Barone F, Minoprio A, Ricceri F, Guarrera S, Russo A, Dalhus B, Crescenzi M, Hübscher U, Björås M, Matullo G, Dogliotti E. Genotype-phenotype analysis of S326C OGG1 polymorphism: a risk factor for oxidative pathologies. *Free Radic Biol Med*. 2013; 63C: 401-409.
 79. Chen SC, Chen CC, Kuo CY, Huang CH, Lin CH, Lu ZY, Chen YY, Lee HS, Wong RH. Elevated risk of hypertension induced by arsenic exposure in Taiwanese rural residents: possible effects of manganese superoxide dismutase (MnSOD) and 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) genes. *Arch Toxicol* 2012; 86: 869-78.
 80. AUSL 7 di Siena. Monitoraggio biologico dell'esposizione a mercurio e arsenico nella popolazione del Monte Amiata, versante senese, 2009.

-
81. Soleo L, Lovreglio P, Panuzzo L, D'Errico MN, Basso A, Gilberti ME, Drago I, Tomasi C, Apostoli P. Health risk assessment of exposure to metals in the workers of the steel foundry and in the general population of Taranto (Italy). *G Ital Med Lav Ergon*. 2012;34(4): 381-91. Italian.
82. ATSDR, Agency for Toxic Substances & Disease Registry. Toxicological Profile for Arsenic. (2007). Available at <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=22&tid=3>.
83. ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Documentation of the Threshold Limit Values and the Biological Exposure Indices, 7th edition. 2001. Available at <http://www.acgih.org/Products/beiintro.htm>.



Glossari / Glossaries

Glossario arsenico

Proprietà chimico-fisiche di As	
Nome	Arsenico
Simbolo	As
Numero atomico	33
Gruppo	15, (Va)
Periodo	4
Serie chimica	metalloidi (non metalli)
CAS	7740-38-2
RTECS	CG0525000
ICSC	13
Aspetto	cristalli fragili, grigi con aspetto metallico, inodore
Massa atomica	74,9
Configurazione elettronica	$1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4d^{10} 4s^2 4p^3$
Energia di prima ionizzazione	947
Energia di seconda ionizzazione	1798
Energia di terza ionizzazione	2735
Energia di quarta ionizzazione	4837
Stati di ossidazione	-3, 0, +3, +5
Densità	5,7 g/cm ³
Punto di fusione	814° C
Punto di ebollizione	615° C
Solubilità di acqua	insolubile
Classe di cancerogenicità	1
Gruppo mutageno per le cellule germinali (DFG 2004)	3A

As(III): forma inorganica come ossianione trivalente

As(V): forma inorganica come ossianione pentavalente

As_i: somma di As(III) e As(V)

MMA(III): acido monometilarsonoso

MMA(V): acido monometilarsonico

DMA(III): acido dimetilarsonoso

DMA(V): acido dimetilarsonico

MMA: acido monometilarsonico come somma di MMA(III) e MMA(V)

DMA: acido dimetilarsonico come somma di DMA(III) e DMA(V)

Altre forme, come:

- arsenobetaine (CH₃)₃As+CH₂COO⁻
- arsenocoline (CH₃)₃As+CH₂CH₂OH
- ossidi trimetilarsonici (CH₃)₃AsO
- ione tetrametilarsonio (CH₃)₄As⁺

Indice di metilazione primario

Rapporto tra concentrazioni di MMA e As_i, indica la capacità di metilazione da specie inorganiche a specie monometilata.

Indice di metilazione secondario

Rapporto tra concentrazioni di DMA e MMA, indica la capacità di metilazione tra specie mono e dimetilate.

Indice di metilazione totale

Rapporto tra concentrazioni di DMA e As_i, indica la capacità di metilazione complessiva da specie inorganiche a specie dimetilate.

Glossario statistico matematico-epidemiologico

LOD	Minimo valore di sostanza rilevabile dallo strumento.
Mediana (M)	Valore che lascia il 50% dei dati campionati alla sua destra, ovvero il 50° percentile.
25° percentile (P25)	Valore che lascia il 75% dei dati campionati alla sua destra.
75° percentile (P75)	Valore che lascia il 25% dei dati campionati alla sua destra.
95° percentile (P95)	Valore che lascia il 5% dei dati campionati alla sua destra.
Outliers	Valori anomali che si discostano significativamente dalla mediana, in questo studio sono definiti <i>outliers</i> i valori al di sopra del 95° percentile.
Media geometrica (MG)	Esponenziale della media dei logaritmi dei dati campionari.
Deviazione standard (DS)	Indice di variabilità di un campione.
Valore di p osservato	Valore di probabilità osservata da un test che indica la probabilità di rifiutare l'ipotesi nulla (non associazione tra variabili in studio) in presenza di associazione vera (falso positivo); di solito l'associazione è definita statisticamente significativa se $p < 0,05$.
Intervallo di confidenza al 95% di probabilità	Intervallo delimitato da un limite inferiore e uno superiore in cui vi è un livello di confidenza del 95% che il parametro in studio sia nell'intervallo.
In	Logaritmo naturale.
Test t per dati indipendenti	Test per confrontare due medie calcolate su due campioni indipendenti.
Test chiquadro	Test per confrontare l'associazione tra variabili qualitative.
Test del rapporto di verosimiglianza	Test per confrontare la bontà di adattamento di due modelli statistici.
Regressione lineare semplice	Modello per valutare l'effetto di una fattore esplicativo su una variabile campionaria.
Albero decisionale	Modello predittivo, nella cui struttura ad albero ogni nodo interno è rappresentato da una variabile, l'arco verso un nodo figlio rappresenta un possibile valore per quella variabile, i nodi terminali rappresentano le classificazioni e le ramificazioni rappresentano l'insieme delle proprietà che portano a quelle classificazioni.
Regressione multilineare	Modello per valutare l'effetto di più fattori che si ipotizza abbiano un'influenza su una variabile campionaria.
RMG grezzo	Rapporto di due medie geometriche (media del gruppo esposto ad un fattore di interesse e media di quello non esposto) stimate da un modello di regressione lineare semplice. Per esempio un RMG di 1,5 significa che il gruppo esposto a un fattore di interesse presenta una media del 50% in più rispetto a quella del gruppo non esposto.
RMG aggiustato	Rapporto di due medie geometriche stimate da un modello di regressione multilineare. Per esempio un RMG di 1,5 significa che il gruppo esposto a un fattore di interesse presenta una media del 50% in più rispetto a quella del gruppo non esposto a parità (aggiustamento o correzione) di altre condizioni di esposizione.

Glossario genetica-epigenetica

Polimorfismo genetico. Si parla di polimorfismo genetico quando una variazione genetica ha una prevalenza maggiore dell'1% nella popolazione.

AS3MT (Met287Thr). L'enzima AS3MT è implicato nel processo di metilazione ossidativa dell'arsenico nell'organismo. Il polimorfismo Met287Thr nel gene AS3MT è associato a una maggiore attività enzimatica con conseguenti variazioni nel metabolismo dell'As. In particolare, i portatori dell'allele mutato AS3MT *287Thr* presentano una variazione del profilo standard di escrezione dei metaboliti urinari dell'arsenico con una maggiore presenza di metaboliti metilati (in particolare MMA).

GSTT1- GSTM1 (+/-). Gli enzimi della glutatione transferasi (GST) GSTT1 e GSTM1 sono implicati nei processi di detossificazione dell'organismo dagli xenobiotici. Gli individui portatori del polimorfismo nullo dei geni GST hanno una minore capacità di detossificazione rispetto agli individui *wildtype*. Dati presenti in letteratura indicano che in popolazioni esposte all'arsenico gli individui mutati presentano maggiori concentrazioni di As₃ e dei suoi metaboliti nelle urine.

hOGG1 (Ser326Cys). L'enzima hOGG1 è implicato nel meccanismo di riparazione del danno ossidativo sul DNA. Il polimorfismo Ser326Cys nel gene hOGG1 è associato a una minore attività enzimatica e a una minore capacità di riparazione del danno al DNA.

XRCC1 (Arg399Gln). Il gene XRCC1 codifica per una proteina deputata alla riparazione (*base excision repair*) di danni al DNA. Il polimorfismo Arg399Gln nel gene XRCC1 è associato a una minore attività enzimatica e a una minore capacità di riparazione. Si osserva che individui portatori del genotipo mutato XRCC1 *399Gln* presentano un aumento delle rotture della doppia elica del DNA.

p16, p21 e p53. Si tratta di proteine che presiedono al controllo del *ciclo cellulare*. Dati presenti in letteratura mostrano come l'esposizione cronica all'As sia correlata ad alterazioni nella metilazione del DNA (ipermetilazione promotore-specifica) con una conseguente riduzione dei livelli di espressione genica.

Glossario stress DNA e apoptosi

Fosforilazione dell'istone H2AX

Le rotture sul doppio filamento (DSB) indotte nella doppia elica di DNA da diversi agenti cancerogeni, tra cui l'arsenico, rappresentano il tipo di lesione più grave per l'integrità genomica, essendo queste le più difficili da riparare. La fosforilazione dell'istone H2AX sul residuo di Serina 139 in seguito all'esposizione della cellula ad agenti che inducono DSB produce il cosiddetto γ H2AX, che è quindi considerato un marcatore della presenza di DSB nel nucleo della cellula. Viene rilevato tramite un anticorpo specifico diretto contro la forma fosforilata di H2AX.

Immunofluorescenza indiretta

L'immunofluorescenza è una tecnica di indagine condotta mediante anticorpi diretti contro gli antigeni specifici di cui si vuole vagliare la presenza e marcati con sostanze fluorescenti (fluorofori o fluorocromi). I fluorocromi, se colpiti da un fascio di luce a una particolare lunghezza d'onda, hanno la capacità di emettere luce a una lunghezza d'onda maggiore; in tal modo si rendono visibili gli immunocomplessi antigene-anticorpo, consentendo valutazioni qualitative e semiquantitative. I fluorocromi, inoltre, essendo facilmente individuabili e utilizzabili in piccolissime concentrazioni, non alterano significativamente la fisiologia delle cellule; quelli maggiormente utilizzati sono l'isotiocianato di fluoresceina (FITC) e l'isotiocianato di tetrametilrodamina (TRITC).

Poli(ADP-ribosio)

Il poli(ADP-ribosio), o PAR, è un polimero sintetizzato a partire dal NAD⁺ da una famiglia di poli(ADP-ribosio) polimerasi (PARP) in risposta a danni metabolici e ad agenti fisici e chimici che inducono rotture sul DNA. Le cellule in condizioni di stress cellulare sono caratterizzate da un accumulo nucleare di PAR, che si evidenzia mediante l'uso di un anticorpo specifico. La valutazione dei livelli di PAR rappresenta un valido marcatore di stress e danno al DNA.

Glossario rischi cardiovascolari

Aterosclerosi

Patologia degenerativa delle pareti arteriose, caratterizzata da ispessimento dello strato interno che causa il restringimento del lume vasale e, pertanto, un ridotto afflusso di sangue. La riduzione del lume dell'arteria è la conseguenza della formazione, sul suo rivestimento interno, di placche costituite in prevalenza da grassi provenienti dalla circolazione sanguigna; tali placche si riscontrano soprattutto nei soggetti con elevata concentrazione di colesterolo nel sangue e sia il loro numero, sia il loro spessore tendono ad aumentare con il progredire dell'età. L'aterosclerosi può interessare qualunque distretto vascolare – ma i più colpiti sono quello coronarico e quello cerebrale – ed è correlata a fattori di rischio quali fumo, obesità, diabete, ipertensione, ipercolesterolemia e ipertrigliceridemia.

Biomarcatore

Indicatore biologico, genetico o biochimico che può essere messo in relazione con l'insorgenza o lo sviluppo di una patologia, come la presenza di un agente infettivo o l'esistenza di un tumore. Un buon biomarcatore deve possedere un alto valore prognostico e predittivo, ossia essere in grado di predire una malattia e di indirizzarla verso quei trattamenti che potrebbero avere maggior successo. Le caratteristiche richieste a un buon marcatore biologico sono: (a) una correlazione specifica con la malattia; (b) un'adeguata predittività sul tipo di trattamento e sulla risposta; (c) la possibilità di effettuare la determinazione con precisione, in tempi brevi; (d) essere relativamente insensibile a errori di campionamento. Il limite del biomarcatore risiede spesso nella dipendenza da un elevato numero di variabili che possono influire sulla sua concentrazione e forma, alterandone la predittività.

Calcium score coronarico

La quantificazione del calcio coronarico permette di ottenere molte informazioni fondamentali per la stratificazione del rischio cardiovascolare. Tale parametro è solitamente misurabile tramite analisi delle immagini di tomografia assiale computerizzata (TAC). In particolare, da questo tipo di esame è possibile ottenere diversi tipi di punteggio tra i quali particolare importanza riveste lo score di Agaston, standardizzato e indicizzato. Un'ampia letteratura ha dimostrato la correlazione tra il punteggio riguardante la quantificazione del calcio coronarico, la presenza di stenosi calcifiche e l'estensione della patologia ateromastica: il valore di soglia, tale per sospettare la presenza di coronaropatia, deve essere pari o superiore a 400 secondo lo score di Agaston. Tale stratificazione consente non solo di sospettare l'eventuale presenza di stenosi emodinamicamente significative, ma anche la probabilità che quel determinato soggetto possa andare incontro a una sindrome coronarica acuta. Tale punteggio, pur con alcuni limiti, è stimabile anche tramite ecocardiografia, ovvero con una metodica non ionizzante, molto diffusa e meno costosa rispetto alla TAC. Tale approccio è stato utilizzato per il presente progetto.

IMT (Intima Media Thickness – spessore medio-intimale)

Esprime la misura dello spessore della tonaca intima e media delle arterie. L'IMT è comunemente accettata come un ottimo indice surrogato di aterosclerosi non solo carotidea, ma anche di altri distretti vascolari, fra cui quello coronarico. È stata dimostrata, sulla base di diversi studi, l'associazione tra IMT carotideo e presenza/gravità di malattia coronarica valutata angiograficamente, motivo per cui è stato proposto l'uso dell'IMT come *marker* di malattia coronarica. È stato altresì dimostrato come in soggetti con IMT elevato la prevalenza di infarto miocardico fosse più che raddoppiata rispetto ai soggetti con IMT basso. Essa viene misurata tramite elaborazione delle immagini ecografiche. In particolare, l'applicazione di algoritmi automatici di inseguimento di contorni permette di individuare le interfacce del lume del vaso – tonaca intima e tonaca media – tonaca avventizia; la distanza tra tali interfacce esprime la misura dello spessore ricercato.

Cardiovascular suite

Cardiovascular suite è un sistema per la valutazione di biomarker di rischio cardiovascolare. La suite si compone di un set di applicativi (*studios*) dedicati alla misura di diversi parametri su diversi distretti dell'apparato cardiovascolare. Questi applicativi sono basati su imaging a ultrasuoni ed elaborazione di immagini ecografiche (è richiesto l'uso di un apparato ecografico per la creazione delle immagini). La suite si basa su computer Apple Mac OSX; tali computer sono dotati di un sistema di acquisizione video Canopus (Grass Valley, Inc.) per l'acquisizione di segnali video analogici e digitali. L'applicativo utilizzato in questo progetto è il Carotid studio, il quale consente l'analisi di sequenze di immagini ecografiche della carotide allo scopo di fornire informazioni correlate allo stato di salute vascolare e, quindi, al rischio cardiovascolare del paziente. Il sistema è in grado di calcolare contemporaneamente sia parametri strutturali sia parametri funzionali. Il principale parametro strutturale è l'IMT, ovvero la misura dello spessore del vaso arterioso. I principali vantaggi offerti dal sistema sono la misura contemporanea dei parametri di spessore e rigidità dell'arteria, l'analisi in tempo reale e l'editing/supervisione dei segnali che consente di includere o escludere eventuali tratti di segnali caratterizzati da basso rapporto segnale-rumore o dalla presenza di *outlier*.

DICOM (Digital Imaging and Communications in Medicine)

Lo standard definisce i criteri per la comunicazione, la visualizzazione, l'archiviazione e la stampa di informazioni di tipo biomedico quali ad esempio immagini radiologiche o ecografiche. Lo standard DICOM è pubblico, nel senso che la sua definizione è accessibile a tutti. La sua diffusione si rivela estremamente vantaggiosa perché consente di avere una solida base di interscambio di informazioni tra apparecchiature di diversi produttori, server e PC, specifica per l'ambito biomedico.

sFTP (Secure File Transfer Protocol)

In telecomunicazioni e informatica l'sFTP è un protocollo di rete che prevede il trasferimento dei dati e funzionalità di manipolazione. È tipicamente usato con il protocollo SSH-2 che utilizza un trasferimento dei file sicuro, anche se è utilizzabile con un qualsiasi altro protocollo. Gli obiettivi principali di FTP sono promuovere la condivisione di file (programmi o dati), incoraggiare l'uso indiretto o implicito di computer remoti, risolvere in maniera trasparente incompatibilità tra differenti sistemi di stoccaggio file tra *host* e trasferire dati in maniera affidabile ed efficiente.

Indice delle tabelle, grafici e figure / Index of tables, charts and figures

Tabelle/Table

Tabella 1.	Distribuzione per area dei soggetti reclutati secondo gli obiettivi prefissati, la rispondenza al contatto, l'adesione all'intervista e al prelievo	38
Table 1.	<i>Distribution by area of subjects recruited according to predetermined goals, their responsiveness to the contact, the adhesion to the interview and the sampling</i>	
Tabella 2.	Tabella delle numerosità campionarie dei dati raccolti, stratificati per area, per sesso e per classi di età	39
Table 2.	<i>Table of sample size of data collected, stratified by area, sex and age classes</i>	
Tabella 3	Responsabilità e compiti delle Unità operative di SEpiAs	40
Table 3	<i>Responsibilities and tasks of SEpiAs Operating units</i>	
Tabella 4	Parametri operativi utilizzati dall'Unità operativa 7	46
Table 4	<i>Operative parameters used by Operative unit 7</i>	
Tabella 5	Variabili selezionate per l'analisi esplorativa	50
Table 5	<i>Variables selected for explorative analysis</i>	
Tabella 6	Soggetti campionati per area e per sesso	54
Table 6	<i>Sampled subjects by area and sex</i>	
Tabella 7	Numerosità dei soggetti, per area e per sesso, in base alle forme arsenicali non rilevabili dallo strumento	54
Table 7	<i>Subjects' number by area and sex, on the basis of arsenical forms detected by the instrument</i>	
Tabella 8	Statistiche descrittive per area e per sesso di As_i	55
Table 8	<i>Descriptive statistics on iAs by area and sex</i>	
Tabella 9	Statistiche descrittive per area e per sesso di As_i +MMA+DMA	56
Table 9	<i>Descriptive statistics on iAs+MMA+DMA by area and sex</i>	
Tabella 10	Numero e percentuale di campioni con $As_i > 1,5 \mu g/l$, per area e per sesso	56
Table 10	<i>Number and percentage of sample with $iAs > 1,5 \mu g/l$ by area and sex</i>	
Tabella 11	Numero e percentuale di campioni con As_i +MMA+DMA $> 15 \mu g/l$, per area e per sesso	56
Table 11	<i>Number and percentage of sample with iAs+MMA+DMA $> 15 \mu g/l$ by area and sex</i>	
Tabella 12	Numero e percentuale di campioni con $As_i > 3,86 \mu g/l$, per area e per sesso	57
Table 12	<i>Number and percentage of sample with $iAs > 3,86 \mu g/l$ by area and sex</i>	
Tabella 13	Concentrazioni delle specie di arsenico misurate, sul totale dei soggetti e per sesso	57
Table 13	<i>Concentrations of arsenic species measured on the total of the subjects and by sex</i>	
Tabella 14	Concentrazioni di arsenico totale e quattro specie misurate, "altre forme" stimate e rapporto sul totale	58
Table 14	<i>Concentrations of total arsenic and of 4 species measured, "other forms" estimated and ratio on the total</i>	
Tabella 15	Mediana dei valori degli indici di metilazione individuali	59
Table 15	<i>Median of the individual methylation index values</i>	
Tabella 16	Mediana dei valori del rapporto individuale tra $As(III)$ e $As(V)$	59
Table 16	<i>Median of the values of the individual ratio between $As(III)$ and $As(V)$</i>	
Tabella 17	Stime delle medie geometriche di As_i per area e per sesso con i relativi intervalli di confidenza al 95% di probabilità	60
Table 17	<i>iAs geometric mean estimation by area and sex with confidence intervals at 95% probability</i>	
Tabella 18	Stime delle medie geometriche di As_i +MMA+DMA per area e per sesso con i relativi intervalli di confidenza al 95% di probabilità	60
Table 18	<i>iAs+MMA+DMA geometric means estimation by area and sex with confidence intervals at 95% probability</i>	
Tabella 19	Codici identificativi dei modelli, loro descrizione e numerosità	61
Table 19	<i>Identifications codes of the model, their descriptions and number of cases</i>	
Tabella 20	Confronto tra le variabili emerse dagli studi effettuati per As_i sulle quattro aree, nei modelli congiunti M+F. Tutte le variabili mostrano un'associazione con As_i con $p < 0,20$	62
Table 20	<i>Comparison among variables emerged from studies on iAs carried out in the four areas, in M+F models. All variables show an association with iAs with $p < 0,20$</i>	
Tabella 21	Confronto tra le variabili emerse dagli studi effettuati per As_i +MMA+DMA sulle quattro aree, nei modelli congiunti M+F. Tutte le variabili mostrano un'associazione con As_i con $p < 0,20$ / Comparison among the most interesting	62
Table 21	<i>Comparison among variables emerged from studies on iAs+MMA+DMA carried out on the four areas, in the M+F models. All variables show an association with iAs with $p < 0,20$</i>	
Tabella 22	Valutazione delle associazioni tra As_i ($< 0 \geq 3,86 \mu g/L$) e i fattori di esposizione individuati all'interno del questionario	67
Table 22	<i>Assessment of associations among iAs ($< 0 \geq 3,86 \mu g/L$) and exposure factors identified within the questionnaire</i>	
Tabella 23	MG e RMG grezzo per zona, sesso, consumo di pesce nei tre giorni precedenti il prelievo, AS3MT, GST-T	68
Table 23	<i>Geometric mean and geometric mean ratio by area, sex, fish consumption three days before the sampling, AS3MT and GST-T1</i>	

Tabella 24	Matrice di associazione tra le variabili del questionario selezionate	71
Table 24	<i>Association matrix among variables selected from the questionnaire</i>	
Tabella 25	Riassunto dei risultati statisticamente significativi ($p < 0,11$) rispetto all'associazione tra PAR e γ H2AX, concentrazione di As_i e polimorfismi genetici	72
Table 25	<i>Summary of statistically significant results ($p < 0,11$) respect to the association among PAR and γH2AX, iAs concentration and genetic polymorphisms</i>	
Tabella 26	Analisi delle associazioni tra IMT e concentrazioni di As_i	73
Table 26	<i>Analyses of the associations between IMT and iAs concentrations</i>	
Tabella 27	Caratteristiche principali dei soggetti emersi come outlier utilizzando 25 μ g/l di concentrazione dell' As_i come cut-off	77
Table 27	<i>Principal characteristics of subjects identified as outliers using $iAs=25 \mu$g/l as cut-off</i>	

Grafici/Charts

Grafico 1	Distribuzione di As_i nei campioni, per area e per sesso (la linea in colore indica il riferimento per As_i di 1,5 μ g/l)	55
Chart 1	<i>iAs distribution in samples, by area and sex (the coloured line represents the reference value for iAs of 1,5 μg/l)</i>	
Grafico 2	Distribuzione di As_i +MMA+DMA nei campioni, per area e per sesso (la linea rossa indica il riferimento per As_i +MMA+DMA di 15 μ g/l)	56
Chart 2	<i>iAs+MMA+DMA distribution in samples, by area and sex (the red line represents the reference value for iAs+MMA+DMA of 15 μg/l)</i>	
Grafico 3	Ripartizione delle specie di arsenico misurate, sul totale dei soggetti e per sesso	57
Chart 3	<i>Repartition of arsenic species measured on the total of the subjects and by sex</i>	
Grafico 4	Ripartizione delle specie di arsenico misurate, per area e per sesso	58
Chart 4	<i>Repartition of arsenic species measured, by area and sex</i>	
Grafico 5	Grafico delle medie geometriche di As_i per area e per sesso coi relativi intervalli di confidenza al 95% di probabilità	60
Chart 5	<i>Chart of iAs geometric means by area and sex with confidence intervals at 95% probability</i>	
Grafico 6	Grafico delle medie geometriche di As_i +MMA+DMA per area e per sesso coi relativi intervalli di confidenza al 95% di probabilità	60
Chart 6	<i>Chart of iAs+MMA+DMA geometric means by area and sex with confidence interval at 95% probability</i>	
Grafico 7	Differenze aggiustate di IMT medio tra i soggetti con $As_i < 3,86 \mu$ g/L e $As_i \geq 3,86 \mu$ g/l	74
Chart 7	<i>Adjusted differences of mean IMT among subjects with $iAs < 3,86 \mu$g/L and $iAs \geq 3,86 \mu$g/l</i>	

Figure/Figure

Figura 1	Esposizione ad arsenico nei Comuni del Lazio. Dati ARPA Lazio, 2005-2010	41
Figure 1	<i>Arsenic exposure in Lazio municipalities. Data from ARPA Lazio, 2005-2010</i>	
Figura 2	Comuni toscani. Cerchiato il Comune di Abbadia San Salvatore (SI)	42
Figure 2	<i>Tuscan municipalities. Abbadia San Salvatore municipality (SI) is circled</i>	
Figura 3	Insedimenti industriali e urbani di Taranto	43
Figure 3	<i>Industrial and urban settlements of Taranto</i>	
Figura 4	Estensione del sito di interesse nazionale (SIN) che comprende il Comune di Gela (CL)	44
Figure 4	<i>Extension of the national priority contaminated site (NPCS) which includes Gela municipality (CL)</i>	

Indice degli allegati (CD) / Table of annexes (CD)

- ALLEGATO 1 Protocollo di studio
- ALLEGATO 2 Lettera al medico curante
- ALLEGATO 3 Modulo consenso informato per la donazione di sangue e urina
- ALLEGATO 4 Modulo consenso informato per gli esami cardiovascolari
- ALLEGATO 5 Scheda informativa per il paziente. Analisi del sangue e delle urine
- ALLEGATO 6 Scheda informativa per il paziente per gli esami cardiovascolari
- ALLEGATO 7 Dichiarazione di assenza di conflitto di interessi (Principal investigator)
- ALLEGATO 8 Dichiarazione di assenza di conflitto di interessi (Responsabili delle Unità operative)
- ALLEGATO 9 Volantino informativo (con specifiche diverse per ciascuna delle quattro aree)
- ALLEGATO 10 Locandina (con specifiche diverse per ciascuna delle quattro aree)
- ALLEGATO 11 Accordo di collaborazione col Ministero della salute
- ALLEGATO 12 Questionario
- ALLEGATO 13 Descrizione delle variabili del questionario per area e per sesso
- ALLEGATO 14 Relazione delle attività svolte dall'Unità operativa 7
- ALLEGATO 15 Caratterizzazione ambientale e sanitaria delle aree in studio effettuata dalle rispettive UO
- ALLEGATO 16 Relazione delle attività svolte dall'Unità operativa 5
- ALLEGATO 17 Relazione delle attività svolte dall'Unità operativa 6
- ALLEGATO 18 Relazione delle attività svolte dall'Unità operativa 8
- ALLEGATO 19 Descrizione per area, per sesso e per classi di età dei campioni di arsenico totale suddiviso in As(III), As(V), MMA, DMA e altre specie arsenicali
- ALLEGATO 20 Analisi esplorativa
- ALLEGATO 21 Analisi descrittive univariate relative a variabili del questionario e a marcatori genetici
- ALLEGATO 22 RMG grezzi e aggiustati per variabili per cui si ipotizzano associazioni con As_i e As_i+MMA+DMA
- ALLEGATO 23 Grafici dei risultati delle analisi di associazioni tra fattori di esposizione e concentrazioni di arsenico tenendo conto di fattori di confondimento o di modificazione di effetto
- ALLEGATO 24 Analisi sugli indicatori PAR e H2AX in funzione dell'area, del sesso, dei polimorfismi e dell'arsenico
- ALLEGATO 25 Analisi delle associazioni tra PAR e H2AX e concentrazioni di arsenico
- ALLEGATO 26 Analisi su IMT in funzione dell'area, del sesso, dei polimorfismi e della concentrazione di arsenico



**EPIDEMIOLOGIA
& PREVENZIONE**

ABBONAMENTI 2014 A CIASCUNO IL SUO

	E&P on-line + Suppl on-line	E&P on-line + E&P di carta + Suppl on-line	E&P on-line + E&P di carta + supplementi di carta
PRIVATI ITALIA			
1 anno	72 euro	80 euro	95 euro
2 anni	135 euro	150 euro	180 euro
3 anni	190 euro	210 euro	250 euro
ENTI ITALIA AD ACCESSO UNICO ENTI ITALIA AD ACCESSO MULTIPO: ABBONAMENTI DA CONCORDARE CON L'EDITORE			
1 anno	148 euro	155 euro	170 euro
2 anni	275 euro	290 euro	320 euro
3 anni	390 euro	410 euro	450 euro
ENTI ESTERO			
1 anno	165 euro	180 euro	210 euro
2 anni	310 euro	335 euro	395 euro
3 anni	425 euro	475 euro	555 euro
PRIVATI ESTERO			
1 anno	85 euro	100 euro	130 euro
2 anni	160 euro	190 euro	245 euro
3 anni	225 euro	265 euro	350 euro

PROMOZIONI 2014

- **Per giovani epidemiologi:** abbonamento on line a 45 euro per gli under 30.
- **Per generosi epidemiologi già abbonati a E&P:** regala un abbonamento a E&P per il 2014. Costa solo 50 euro per l'edizione on line e 60 euro per avere anche il cartaceo. Ovviamente, l'abbonamento sarà accompagnato da un biglietto che svelerà l'identità del donatore per fare una gran bella figura e nello stesso tempo aiutare E&P.
- **Per epidemiologi "contagiosi":** se ti piace E&P e fai sottoscrivere due nuovi abbonamenti a chi non conosce la rivista o non è più abbonato da almeno due anni, il tuo abbonamento o il tuo rinnovo è gratuito.

EPIDEMIOLOGIA & PREVENZIONE Modalità di abbonamento per il 2014

data Abbonamento annuo a partire dal primo numero raggiungibile:

Tipo di abbonamento **euro**

Modalità di pagamento:

Versamento: a mezzo conto corrente postale n. 55195440 intestato a Inferenze scarl, via Ricciarelli 29, 20148 Milano (allegare la ricevuta di versamento alla richiesta di abbonamento)

PayPal: sul sito www.epiprev.it

Bonifico bancario: UNIPOL BANCA, Pza Wagner 8, 20145 Milano IBAN IT 53 P 03127 01600 0000 0000 3681 intestato a Inferenze scarl, via Ricciarelli 29, 20148 Milano (allegare la contabile alla richiesta di abbonamento)

Carta di credito: American Express Carta Si Master Card Eurocard VISA

cognome e nome

azienda

indirizzo

cap località prov.

tel. fax. e-mail

numero _ _ _ _ _ scadenza _ _ / _ _ / _ _ firma

cod. CV2 _ _ _ (ultime tre cifre stampate sul retro della carta, per una garanzia di sicurezza in più)

Compilare e inviare a Inferenze - via Ricciarelli 29, 20148 Milano; e-mail abbonamenti@inferenze.it o per fax allo 02 48706089

eip