

14 **FOCUS**
Inquinamento e
fertilità maschile

38 **FOCUS**
Prototipo per la
protonterapia

106 **PUNTO E CONTROPUNTO**
Ricerca pubblica
e privata

Energia ambiente e innovazione

ENEA magazine

N. 3/2017
www.enea.it

La Sanità *tra Scienza e Tecnologia*

Intervista

Beatrice Lorenzin,
Ministro della Salute

Editoriale



di Federico Testa e Walter Ricciardi

Questo numero della Rivista è il frutto del lavoro congiunto tra l'ENEA e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS), sul tema della salute. Se la scelta del tema può apparire abbastanza scontata per l'ISS, che si è sempre posto l'obiettivo di fare ricerca per la salute promuovendo tanto la ricerca di base quanto la ricerca traslazionale e applicata, può forse essere meno scontata la partecipazione dell'ENEA.

In realtà l'ENEA è da tempo impegnata sui temi della salute e lo dimostra il ciclo di eventi, dedicato a questo tema, che hanno visto coinvolti tanti ricercatori dell'Ente e tanti ricercatori esterni.

La salute, infatti, non è solo un grande e indiscutibile valore in sé, ma è anche motore di sviluppo, innovazione e crescita economica sostenibile. I piani programmatici nazionali e internazionali indicano tra le priorità di ricerca e sviluppo le scienze della vita.

La natura dell'Agenzia fa sì che, nelle sue attività sulla salute, l'interesse sia maggiormente posto sullo sviluppo di soluzioni innovative, efficaci e sostenibili, attraverso l'integrazione delle sue competenze in biotecnologie, biomedicina, fisica, scienza dei materiali e sistemi di calcolo, in collaborazione con le imprese, il sistema ospedaliero e il territorio. Uno dei principali settori di intervento è rappresentato dall'applicazione delle radiazioni ionizzanti e non-ionizzanti a scopo diagnostico e terapeutico, a partire da ricerche sulla biologia dei tumori fino alla sperimentazione preclinica.

È risultato naturale, quindi, focalizzare l'attenzione sul binomio tra tecnologia e salute e sull'interazione tra ambiente e salute, ambiti nei quali l'ENEA e l'ISS vantano numerose collaborazioni, tanto su progetti di carattere nazionale quanto internazionale, che si è cercato di mettere in luce in questo numero.

Partiamo dal binomio tra tecnologia e salute, tematica che i piani programmatici nazionali e internazionali indicano tra le priorità di ricerca e sviluppo per le sue potenziali ricadute sul sistema produttivo e sull'aumento del benessere dei cittadini. Su questo tema il Ministro della Salute nella

sua intervista ha confermato l'impegno del suo Dicastero negli anni a venire. In questo contesto e in una realtà caratterizzata da un'evoluzione sempre più rapida delle tecnologie, la sfida che si pongono ISS ed ENEA è di riuscire sempre più a valorizzare e a trasferire con successo le competenze avanzate di cui dispongono in questo settore grazie all'impegno dei propri ricercatori e tecnologi per lo sviluppo di soluzioni innovative efficaci e sostenibili.

Ne è un esempio il progetto TOP-IMPLART, originato da un finanziamento iniziale dell'ISS e Ministero Salute risalente agli anni 90 e dal 2012 finanziato dalla Regione Lazio. Il Progetto punta a realizzare, presso l'Istituto Regina Elena di Roma, un innovativo acceleratore lineare di protoni per radioterapie oncologiche.

Altri ambiti di collaborazione sono relativi alla ricerca sulle radiazioni, attraverso il progetto CONCERT, European Joint Programme dell'EURATOM, finalizzato a sviluppare la Strategic Research Agenda e la roadmap della ricerca Europea nell'ambito della radioprotezione o il progetto RENEb (Realizing the European Network of Biological Dosimetry), oramai conclusosi, che aveva come obiettivo la creazione di una rete europea in grado di operare sia nell'ambito della risposta alle emergenze radiologiche che nel settore della ricerca sulle radiazioni. Oggi l'attività prosegue con il progetto europeo omonimo RENEb (Running the European Network of Biological and Physical Retrospective Dosimetry), che coinvolge 26 istituzioni da 17 Paesi che si propone di fornire ai diversi paesi associati un supporto adeguato in caso di emergenze.

Le interazioni tra ambiente e salute, estremamente complesse e difficili da valutare, costituiscono un altro grande tema di collaborazione tra i due Enti. Ad oggi gli impatti meglio conosciuti sulla salute sono associati all'inquinamento atmosferico, alla scarsa qualità dell'acqua e a condizioni igienico-sanitarie insufficienti, mentre sappiamo molto meno sugli impatti sulla salute delle sostanze chimiche pericolose e del rumore.

Altre tematiche emergenti per l'ambiente e la salute, sono il cambiamento climatico, l'impoverimento dell'ozono stratosferico, la perdita di biodiversità e il degrado del suolo. Rispetto a queste tematiche, l'ISS – attraverso il Dipartimento Ambiente e Salute – collabora con l'ENEA, in particolare con il Dipartimento Sostenibilità dei Sistemi Produttivi e Territoriali nella definizione degli aspetti tossicologici ed epidemiologici dell'inquinamento atmosferico, nonché su problematiche correlate al potenziale tossicologico dei nano-materiali, come testimoniato dai contributi presenti all'interno di questo numero.

Non è inoltre secondaria la collaborazione in atto tra il Centro nazionale tecnologie innovative in sanità pubblica, il Centro nazionale protezione dalle radiazioni e fisica computazionale e il Servizio tecnico-scientifico grandi strumentazioni e *core facilities* dell'ISS, al cui interno si svolgono le attività inerenti, tra l'altro, alla radiazione e alla radioprotezione, e il Dipartimento Tecnologie

Nucleari dell'ENEA, da anni impegnato sul tema della ricerca nucleare e salute. Alcuni articoli hanno come oggetto questi temi ed enfatizzano la collaborazione tra i due Enti.

Dedicare questo numero della Rivista interamente ai progetti che i due Enti stanno realizzando congiuntamente, vuole quindi dare il segnale e la misura dell'impegno che la ricerca in ambito tecnologico sta approfondendo per dare risposte al Sistema Salute. Oltre a ciò dimostra anche la volontà di fare sistema tra Istituzioni del Paese, per fornire soluzioni tempestive ed efficaci ai bisogni della popolazione.

Federico Testa
Presidente ENEA

Walter Ricciardi
Presidente Istituto Superiore di Sanità

N. 3/2017

Direttore Responsabile

Gaetano Borrelli

Comitato di direzione

Gian Piero Celata, Tullio Fanelli, Roberto Moneta, Roberto Morabito, Aldo Pizzuto

Comitato tecnico-scientifico

Paola Batistoni, Ilaria Bertini, Paola Carrabba, Paolo Di Lazzaro, Andrea Fidanza, Giorgio Graditi, Aurelio La Barbera, Sergio La Motta, Michele Marrocco, Laura Maria Padovani, Giovanni Puglisi, Roberta Roberto

Coordinamento editoriale

Giuliano Ghisu

Revisione editoriale

Marina Fortuna

Collaboratori

Luciano De Martino, Paola Del Nero, Maria Grazia Oteri

Revisione lingua inglese

Carla Costigliola

Progetto grafico

Paola Carabotta

Edizione web

Antonella Andreini, Marina Fortuna, Serena Lucibello, Concetta Manto

Promozione e comunicazione

Paola Giaquinto

Impaginazione

DeI Gallo Editori D.G.E. Greenprinting srl
Via Dei Tornitori, 7 - 06049 Spoleto (PG)

Stampa

Laboratorio Tecnografico
Centro Ricerche ENEA Frascati
Numero chiuso nel mese di ottobre 2017

Registrazione

Tribunale Civile di Roma
Numero 148 del 19 aprile 2010 del registro - Stampa



26 Inquinamento atmosferico in contesti urbani e industriali

01 Editoriale

06 Presentazione di Laura Maria Padovani

INTERVISTA

08 a Beatrice Lorenzin, Ministro della Salute

FOCUS

14 Inquinamento ambientale e fertilità maschile

20 Alimenti funzionali: valorizzazione della risorsa
e caratterizzazione nutraceutica

26 Sorgenti e aspetti epidemiologici dell'inquinamento
atmosferico in contesti urbani e industriali

32 Metodi in vitro e in silico per la valutazione
del potenziale tossicologico dei nanomateriali

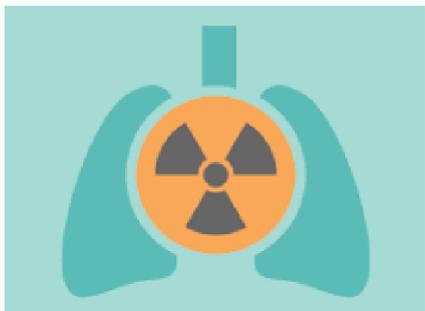
38 Tecnologie e ricadute cliniche di TOP IMPLART,
prototipo di impianto per protonterapia

44 Strategie per lo studio della genetica
della suscettibilità alle radiazioni ionizzanti

50 Papillomavirus umano (HPV) e cancro:
nuove strategie terapeutiche e diagnostiche

56 Utilizzo di nuove tecnologie omiche
per lo studio di patologie umane

Index



86 Protezione dal radon
nella casa e nel lavoro



90 Comunicazione del rischio in
ambito sanitario



94 Epigenetics and the
environment

-
- 62** Il Progetto MOLY:
una via italiana per la produzione
del radiofarmaco ^{99m}Tc
 - 68** Rete capillare, cancro
e legge di Kleiber
 - 74** Rivelatori di radiazione
a stato solido luminescenti: la sfida
della dosimetria in radioterapia
 - 80** Metodi fisici e biologici
per un approccio multiparametrico
alla valutazione della dose individuale
negli incidenti radiologici
 - 86** La protezione dal radon
nelle abitazioni e nei luoghi di lavoro
 - 90** Le sfide per la comunicazione
del rischio in ambito sanitario

QUADRO INTERNAZIONALE

- 94** Epigenetics and the environment
- 98** Global environmental changes
and the impact on ecosystems
and human health

PUNTO & CONTROPUNTO

- 106** Giovanni Leonardi (Direttore
generale Ricerca e Innovazione
in sanità, Ministero della Salute)
ed Eugenio Aringhieri (Chief Executive
Officer Dompé Farmaceutici SpA)

SPAZIO APERTO

- 112** L'Analisi trimestrale dell'ENEA,
uno strumento per la valutazione
della transizione energetica italiana
- 118** Moda e sostenibilità,
tendenze e prospettive
future del settore

COSA SUCCEDDE IN CITTÀ

- 122** La tangenziale 'verde',
una proposta di riqualificazione
urbana per Roma

Presentazione



di **Laura Maria Padovani**

Il Piano triennale *Health for Growth* 2014-2020 della Commissione Europea sottolinea che la salute non è solo un grande e indiscutibile valore in sé, ma può trainare sviluppo, innovazione e crescita economica sostenibile.

La ricerca nel settore della salute, e la sua traduzione in soluzioni innovative, sono di fondamentale importanza per il progresso scientifico e tecnologico del Paese, per il miglioramento della qualità di vita dei cittadini, e per lo sviluppo dell'industria farmaceutica, biotecnologica e biomedicale. Per l'area tematica "Salute", proprio questi aspetti sono ritenuti prioritari all'interno della Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente (SNSI), promossa da Ministero dello Sviluppo Economico e Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca, quale strumento per individuare le priorità cui destinare le risorse previste dalle politiche di coesione dell'Unione Europea. Obiettivo della SNSI è la promozione nel Paese di una filiera dell'innovazione capace di trasformare i risultati della ricerca in un vantaggio competitivo per il sistema produttivo, oltre ad un aumento del benessere dei cittadini.

È infatti ampiamente riconosciuto che, dopo la tecnologia dell'informazione, le scienze della vita, le biotecnologie e le tecnologie mediche offrono una eccezionale opportunità di rispondere ad esigenze globali relative alla salute, all'invecchiamento, all'alimentazione e all'ambiente.

Se è quindi vero che è imperativo salvaguardare la salute umana come diritto e valore in sé, è allo stesso tempo fondamentale dimostrare la sua importanza in termini di crescita inclusiva e di benessere sociale, mettendo in atto politiche intersettoriali e di integrazione tra settori.

Considerando la necessità di mettere a sistema ricerca di base, ricerca traslazionale * e sistema produttivo, per sviluppare soluzioni innovative e sostenibili il Piano Nazionale della Ricerca 2015-2020 prevede azioni specifiche tra cui: "Valutare e sostenere in maniera selettiva le infrastrutture di ricerca, pilastro della ricerca internazionale, in particolare della ricerca di base" e "Rafforzare la collaborazione pubblico-privato per rafforzare la ricerca applicata, la capacità d'innovazione

e il legame tra ricerca e sfide della società”. Le istituzioni di ricerca pubblica promuovono e sostengono queste azioni, ognuna con il proprio specifico ruolo e compito. I laboratori pubblici di ricerca costituiscono, in questo campo, un elemento fondante della ricerca scientifica di base e applicata.

L’ENEA vanta un’esperienza peculiare nella capacità di promuovere la collaborazione pubblico-privato, ed è pronta a raccogliere questa sfida anche per l’area tematica Salute. Attraverso quattro eventi svolti tra ottobre 2016 e aprile 2017, l’Agenzia ha presentato le principali attività svolte in questo settore, coinvolgendo sia i propri ricercatori che quelli del mondo accademico e della ricerca pubblico e privata, con cui sono state attivate negli anni importanti collaborazioni.

Partendo da questi presupposti, i Presidenti dell’ENEA e dell’Istituto Superiore di Sanità hanno promosso questo numero della rivista dell’ENEA dedicato a “Sanità: tra scienza e tecnologia”. L’“Editoriale”, a loro firma, vede illustrate alcune delle attività portate avanti dalle due Istituzioni, focalizzando l’attenzione sulla partecipazione congiunta ENEA-ISS nelle piattaforme e nei progetti europei.

Aprè il numero una intervista alla Ministra della Salute Beatrice Lorenzin, che risponde a domande sulla Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente, le malattie ad elevato impatto socio-economico, l’impatto della ricerca sul sistema sanitario del Paese, le politiche di prevenzione e monitoraggio dello stato di salute della popolazione rispetto alla presenza di inquinanti ambientali.

La sezione “Focus” contiene contributi su temi che riguardano ambiente, alimentazione e salute, e radioprotezione. Particolare attenzione viene rivolta alle tecnologie per la diagnosi e cura dei tumori.

Nella sezione “Punto & Contropunto” sono messi a confronto i punti di vista di chi si occupa di ricerca pubblica e di ricerca privata, mentre nella rubrica “Quadro internazionale” vengono descritti da una parte gli impatti dei cambiamenti ambientali globali su ecosistemi e salute, dall’altra come l’ambiente circostante influenzi il nostro DNA.

La rubrica “Cosa succede in città” contiene una proposta di riqualificazione urbana per la città metropolitana di Roma, mentre in Spazio aperto si trovano un interessante contributo che mette in relazione moda e sostenibilità e una presentazione dell’Analisi trimestrale del sistema energetico italiano, pubblicata dall’Ufficio Studi dell’ENEA.

** Termine che indica il trasferimento dei risultati delle ricerche sperimentali alle applicazioni, comunemente chiamato anche “trasferimento tecnologico”.*

Intervista a cura di Gaetano Borrelli



a **Beatrice Lorenzin**, *Ministra della Salute*

All'interno della Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente (SNSI), è prevista la promozione nel Paese di una filiera dell'innovazione capace di trasformare i risultati della ricerca in un vantaggio competitivo per il sistema produttivo e in un aumento del benessere dei cittadini. In che modo il Ministero intende rispondere a questa esigenza?

La programmazione 2014-2020 della politica di coesione europea, nell'ambito della quale rientra la "Strategia di Specializzazione Intelligente", pone al centro degli interventi lo sviluppo economico e sociale dei territori guidato dall'innovazione e gestito attraverso un nuovo modello di governance multilivello e multi-stakeholder con la finalità di individuare le priorità di investimento in ricerca, sviluppo e innovazione che completano le risorse e le capacità produttive di un territorio per costruire vantaggi comparati e percorsi di crescita sostenibile nel medio e lungo termine. In particolare, l'Unione Europea ha richiesto, come condizione indispensabile per l'accesso ai fondi della Politica di Coesione 2014-2020, a ciascuno Stato membro e alle articolazioni regionali la definizione di una strategia di innovazione a livello nazionale e regionale basata sull'idea che sia possibile costruire un vantaggio competitivo mettendo in luce le peculiarità e i sistemi innovativi a livello territoriale.

Tenendo conto degli indirizzi europei, in particolare delle sfide della società di Horizon 2020, la Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente individua, attraverso un processo interattivo di cooperazione tra settore pubblico e settore privato, cinque aree tematiche nazionali che rappresentano i nuovi mercati di riferimento, tra cui quella relativa a "salute, alimentazione e qualità della vita". Quest'area tematica è a sua volta articolata in tre sottogruppi: *agrifood*, bioeconomia e

salute; quest'ultimo coordinato dal Ministero della Salute. In particolare, il perimetro dell'area salute, tenuto conto del cambio demografico, dell'invecchiamento della popolazione, dell'aumentata incidenza di molte patologie croniche degenerative e della crescente attenzione alla qualità della vita, fa riferimento all'applicazione di tecnologie chiave abilitanti in ambiti differenziati: settore farmaceutico, biotecnologico, biomedicale, servizi sanitari ecc., a loro volta articolati in una molteplicità di sotto settori che costituiscono un fattore rilevante per le prospettive di sviluppo di questa area di specializzazione. Infatti, a livello nazionale, l'area salute, alimentazione, qualità della vita presenta dati significativi per lo sviluppo di nuovi mercati. In tal senso, occorre sottolineare che l'industria farmaceutica è il primo settore in Italia per crescita della produttività ed è il settore con la più alta quota di imprese che svolgono attività innovativa (81%), dato per il quale l'Italia è seconda in Europa solo alla Germania, e che l'industria biotech italiana si classifica al terzo posto in Europa, dopo la Germania e il Regno Unito, per numero di aziende pure biotech che producono una significativa *pipeline* (403 prodotti a cui si aggiungono altri 67 progetti in fase di *discovery*).

L'identificazione delle traiettorie tecnologiche di sviluppo prioritarie (*priority setting*) a livello nazionale, basandosi su una lettura integrata delle sfide, dei bisogni e delle opportunità legate al tema della salute, è avvenuta attraverso un lavoro congiunto e condiviso tra le Amministrazioni Centrali e quelle Regionali. In particolare, le cinque aree di sviluppo identificate all'interno del sottogruppo salute sono: Active & Healthy Ageing – tecnologie per l'invecchiamento attivo e l'assistenza domiciliare; E-Health, diagnostica avanzata, *medical devices* e mini invasività; Medicina rigenerativa, predittiva e medicina di precisione; Biotecnologie,



bioinformatica e sviluppo farmaceutico; e Nutraceutica, nutri genomica e alimenti funzionali. Obiettivo dunque del Ministero è quello di mettere la ricerca sanitaria al centro per avere cure sempre migliori e di qualità, di farne una priorità nell'agenda di Governo, una calamita di investimenti e investitori dall'estero e una leva decisiva di sviluppo e crescita passando dalla logica della spesa a quella dell'innovazione e dello sviluppo. L'obiettivo è quello di creare – in sinergia con il Ministero dell'Istruzione, Università e Ricerca – una vera e propria infrastruttura per la ricerca, metterla al centro di un sistema, attraverso degli investimenti pubblici che sono indispensabili, perché in questo momento più che mai la ricerca sanitaria ha un valore decisivo per il rilancio dell'economia italiana. Al di là di questo, ulteriori interventi strategici a livello nazionale potrebbero riguardare, a partire dalle realtà regionali, il sostegno alla formazione di una rete di Contract Research Organizations (CRO), su scala nazionale e orientate anche e fortemente ai mercati esteri che costituiscano un primo nucleo di competenze,

anche manageriali, ed attività immediatamente orientate al mercato. Un'ulteriore priorità, in questo caso di carattere riguarda l'individuazione di modelli di ricerca e di business nuovi e maggiormente strutturati di quelli attualmente in uso, basati largamente su spin off accademici e reti di collaborazione più o meno estese, ma spesso fragili e poco robuste. Su questo punto tuttavia la riflessione è ancora agli inizi. Come accennato in precedenza, il modello delle CRO può costituire un promettente punto di partenza per rafforzare il contenuto organizzativo delle attività di ricerca esistenti e avvicinarle al mercato.

Le malattie ad elevato impatto socio-economico, cronico-degenerative (neoplastiche, cardiovascolari, neurologiche, metaboliche), infettive riemergenti, rare e neglette, sono state identificate come una priorità globale dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Nonostante lo sforzo della cosiddetta "medicina sociale" volta a promuovere stili di vita sani come strumento di prevenzione e di

terapia complementare, sembrano necessari passi avanti nella diagnosi e nella diagnostica. Quale è la posizione del Ministero?

Indubbiamente sono necessari passi avanti nella diagnosi e nella diagnostica delle malattie croniche non trasmissibili (MCNT) nonché delle malattie infettive riemergenti, rare e neglette, ma risulta altrettanto fondamentale, alla luce dei trend epidemiologici e demografici, proseguire e rafforzare le attività di prevenzione e di promozione degli stili di vita sani. In tal senso, in linea con gli obiettivi del WHO-Europe Action Plan e in continuità con i precedenti Piani nazionali della prevenzione (2005-2009 e 2010-2013), nel 2014 è stato approvato il nuovo Piano Nazionale della Prevenzione (PNP), che recepisce gli obiettivi del programma “Guadagnare Salute: rendere facili le scelte salutari” (DPCM 4 maggio 2007), la strategia nazionale globale per contrastare i quattro principali fattori di rischio di malattie croniche nel nostro paese, secondo i principi della “Salute in tutte le politiche” (Health in All Policies). Il PNP, di durata quinquennale, delinea pertanto un sistema

di azioni di promozione della salute e di prevenzione, che accompagnano il cittadino in tutte le fasi della vita, nei luoghi di vita e di lavoro. Tale scelta strategica va ricondotta alla convinzione, suffragata da numerosi elementi della letteratura scientifica di settore, che un investimento in interventi di prevenzione, purché basati sull’evidenza scientifica, costituisce una scelta vincente, capace di contribuire a garantire, nel medio e lungo periodo, la sostenibilità del Sistema sanitario nazionale. Infatti, le attività di prevenzione e di tutela della salute pubblica rappresentano un vero e proprio investimento sia per quanto riguarda la promozione di uno stato di salute, benessere e capacità produttiva, sia per gli evidenti benefici economico-finanziari che ne conseguono, di gran lunga eccedenti le risorse richieste. Ciò si applica a settori in cui l’Italia ha da sempre una grande scuola, come ad esempio la salute dei lavoratori o la salute ambientale. Ma si applica anche a settori nuovi e relativamente inesplorati, come la genomica, l’epigenetica, la metabolomica, lo studio del microbioma, che contribuiscono a farci capire i meccanismi di alcune patologie e le differenze nelle reazioni del



corpo umano a parità di esposizione degli individui ad agenti esterni o a fattori ambientali. Lo sviluppo della medicina predittiva o personalizzata, su cui il ragionamento durerà molti anni e di cui iniziamo ora a vederne le implicazioni per carenze scientifiche e tecnologiche, permetterà non solo di impostare ed eseguire terapie efficaci, proprio perché personalizzate, ma anche di risparmiare su terapie inutili, liberando risorse e permettendoci di intervenire molto precocemente con azioni preventive individualizzate e altrettanto personalizzate, da affiancare ai grandi schemi collettivi già descritti. In tal senso il Ministero già dagli scorsi anni sta finanziando numerosi progetti di ricerca che hanno l'obiettivo di sviluppare nuove tecnologie a supporto della diagnosi "personalizzata" delle patologie, quali ad esempio degli oncochip in grado di individuare le alterazioni genomiche del tumore e garantire al paziente cure su misura, grazie ai nuovi farmaci a bersaglio molecolare. Ai progetti di ricerca direttamente finanziati dal Ministero della Salute si aggiungeranno poi quelli finanziati attraverso la Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente relativi allo sviluppo di metodi di diagnostica avanzata, *medical devices* e mini invasività nonché di nuove biotecnologie.

La capacità di ricerca, testimoniata dalla numerosa produzione scientifica, che impatto ha sulla capacità diagnostica e terapeutica del sistema sanitario del Paese?

La ricerca sanitaria è parte integrante delle attività del Servizio Sanitario Nazionale (SSN) ed è un elemento fondamentale per garantire ai cittadini una sanità efficiente e rispondente ai reali bisogni di assistenza e cura del Paese.

Promuovere la ricerca "traslazionale", cioè mirata a tradurre le scoperte scientifiche in innovazione e interventi per la Salute Pubblica, è oggi un obiettivo primario per lo sviluppo scientifico e socio-economico e per il miglioramento del rapporto qualità/costo dei sistemi sanitari nazionali.

Esistono senz'altro criticità nel trasferimento delle conoscenze scientifiche dal laboratorio al letto del paziente, ma ci stiamo impegnando, attraverso varie azioni, a superarle e avviare un processo virtuoso di rafforzamento della ricerca dedicata ai Sistemi sanitari. In tale contesto occorre valorizzare, in una visione unitaria, forze e risorse già presenti nel Servizio Sanitario Nazionale e nel mondo accademico e scientifico, evitando duplicazioni e sovrapposizioni che possano incidere negativamente sull'impatto della stessa ricerca.

È importante quindi promuovere la collaborazione e attuare sinergie fra i vari attori della ricerca, innovazione e trasferimento tecnologico.

Abbiamo già realtà importanti come gli IRCCS, enti che, secondo standard di eccellenza, perseguono finalità di ricerca biomedica, unitamente a prestazioni di ricovero e cura di alta specialità. Sono istituti in cui le due attività di ricerca e cura coesistono, e dove è più agevole e rapido questo flusso osmotico tra le due competenze e conoscenze.

Valorizzando le eccellenze e attuando una strategia di sinergia tra gli IRCCS, si possono migliorare i percorsi e le ricadute a livello di Servizio Sanitario Regionale/ Servizio Sanitario Nazionale. È proprio in questa ottica che il Ministero ha promosso l'organizzazione di reti tematiche (oncologia, cardiovascolare, neuroscienze, pediatria...) in cui gli IRCCS collaborano in stretta sinergia tra di loro. Ciò consente di operare con maggiore competitività, di ottimizzare le risorse economiche e contribuire al benessere dei cittadini, permettendo di individuare e diffondere soluzioni più efficaci, sia nell'ambito di metodiche diagnostiche innovative che nella scelta delle soluzioni terapeutiche e strategie per ridurre fattori di rischio modificabili delle patologie ad "alto impatto".

Ma gli IRCCS non sono le sole strutture di eccellenza. È importante promuovere le interazioni e le collaborazioni con le Aziende Ospedaliere Universitarie, per facilitare la circolazione della conoscenza, la condivisione delle risorse e il trasferimento dei prodotti della ricerca al settore produttivo e ai sistemi sanitari.

Quanto la ricerca di settore trasforma il sistema sanitario nazionale?

Moltissimo, basti pensare a quello che la ricerca ci ha insegnato sulla diagnosi. Innanzi tutto sappiamo ora quanto la diagnosi precoce di malattia sia fondamentale per l'esito di molte patologie. Una diagnosi precoce ed un trattamento adeguato e tempestivo possono in molti casi migliorare l'esito delle cure e la qualità della vita dei pazienti e al tempo stesso, di ridurre l'ospedalizzazione, una delle voci di maggiore costo per il Servizio Sanitario Nazionale. I sistemi di diagnostica avanzata consentono di identificare precocemente specifiche patologie, minimizzando gli errori di diagnosi dovuti alle limitazioni dei percorsi clinici tradizionali e ottimizzando la spesa pubblica.

Ad esempio nel campo dell'oncologia le recenti scoperte in ambito di genetica e biologia molecolare, le nuove conoscenze della biologia dei tumori, e l'evol-

zione generale dei trattamenti hanno comportato delle importanti modifiche nell'approccio diagnostico e terapeutico di buona parte dei tumori solidi.

Si parla sempre di più di medicina di precisione per la quale la diagnosi rappresenta un passo fondamentale. I sistemi diagnostici hanno visto negli ultimi anni un'evoluzione importante: conosciamo ora marcatori biologici per definire il profilo molecolare della malattia e abbiamo a disposizione test predittivi della risposta alle terapie antitumorali. In altre parole, partendo da una puntuale individuazione delle caratteristiche genetiche e molecolari del tumore, è possibile stabilire la terapia migliore. L'evoluzione dei test di cui disponiamo oggi, permetterà di monitorare la risposta alla terapia del singolo paziente, con l'obiettivo di ottimizzare il trattamento per il miglior risultato. Un'opportunità che può e deve essere garantita a tutti, indipendentemente dal centro in cui il paziente è preso in carico.

Proprio per valutare se la dotazione tecnologica dei nostri ospedali sia in grado di rispondere ai bisogni di diagnosi della popolazione, nel 2016 abbiamo fatto una mappatura delle apparecchiature ospedaliere ed extra ospedaliere, un primo passo necessario per ridurre le disomogeneità regionali.

Qual è il ruolo del Ministero della Salute sulle politiche di prevenzione e monitoraggio dello stato di salute della popolazione rispetto alla presenza di inquinanti ambientali, alcuni considerati molto pericolosi a livello internazionale come le polveri sottili?

Mentre le attività di controllo dei livelli di inquinamento dell'aria sono di competenza delle agenzie per l'ambiente regionali e del Ministero dell'Ambiente, il Ministero della Salute conduce, tramite i suoi organi territoriali e l'Istituto Superiore di Sanità, una attenta sorveglianza degli effetti sanitari dovuti all'esposizione della popolazione ad inquinamento atmosferico. Il Ministero già da anni finanzia studi volti a stimare il carico di patologie attribuibili all'inquinamento dell'aria con particolare attenzione alle polveri PM10 e PM2.5. Nel 2013 il Ministero ha finanziato lo studio "Valutazione Integrata dell'Impatto dell'Inquinamento atmosferico sull'Ambiente e sulla Salute" che ha stimato la mortalità attribuibile agli inquinanti che in Italia presentano le maggiori criticità ovvero il PM2.5, l'ozono e gli ossidi di azoto. Inoltre l'Istituto Superiore di Sanità, quale organo tecnico scientifico del Servizio sanitario nazionale, porta avanti con continuità attività di ricerca, controllo e sorveglianza della salute delle popolazioni ed in particolare, il Dipartimento

Ambiente e Salute, è dedicato alle attività di ricerca e controllo degli aspetti sanitari collegati alla qualità dell'ambiente, in generale, e dell'aria in particolare. Come noto, oltre alle aree urbane, sono molto rilevanti gli studi degli effetti sanitari dell'inquinamento dell'aria connessi all'esposizione agli inquinanti emessi da insediamenti industriali. Ricordiamo, a tale proposito, lo studio Sentieri che ha analizzato la mortalità e successivamente anche i ricoveri ospedalieri e l'incidenza dei tumori nei Siti di interesse Nazionale. Allo stesso settore appartiene lo studio di biomonitoraggio condotto a Taranto, a seguito dei noti eventi legati all'ILVA, progetto attivato e finanziato dal Ministero per studiare l'esposizione della popolazione agli inquinanti in aria emessi dall'industria.

Il Ministero è principalmente interessato a definire strategie di prevenzione degli effetti sanitari e a tale proposito sono state recentemente redatte le Linee Guida per la valutazione di impatto sanitario (VIS), risultato di un ulteriore progetto finanziato dal Ministero. Queste Linee Guida rappresentano uno strumento operativo utile a controllare e ridurre i potenziali impatti sulla salute determinati dall'insediamento di opere e progetti sul territorio, inclusi gli impatti determinati dalle emissioni in aria.

Inoltre il Ministero partecipa attivamente alla ricerca di strategie riguardante la promozione della salute attraverso azioni di mobilità sostenibile finalizzate non solo alla riduzione dell'incidentalità stradale, ma anche di soluzioni che soddisfino le esigenze di mobilità delle persone e delle merci riducendo tuttavia gli impatti ambientali e sanitari conseguenti.

Di fronte ai problemi di inquinamento, non solo urbano, il Ministero quali collaborazioni ha stabilito con gli altri Ministeri, con le Regioni e con le grandi aree urbane per attuare politiche volte al rafforzamento del binomio Salute e Ambiente?

Lo strumento più importante messo in atto dal Ministero è sicuramente il Piano Nazionale di Prevenzione, adottato la prima volta per il triennio 2005-2007, e poi da allora sempre rinnovato. Il Piano nasce da un'intesa del Ministero con le Regioni e le Province Autonome. Questa governance compartecipata del Piano Nazionale di Prevenzione ha prodotto un processo culturale innovativo, identificando ad ogni rinnovo, nuovi obiettivi specifici da raggiungere tramite l'adozione di specifiche linee operative. È tramite questo processo che a cominciare dal Piano 2010-2012 si introduce l'Obiettivo di Prevenzione dell'esposizione, professionale e

non, ad agenti chimici, fisici e biologici che include tra le linee operative, la definizione di strategie per tutelare gli individui dall'esposizione ad inquinamento ambientale, incluso l'inquinamento atmosferico. Questo obiettivo è rafforzato nell'ultimo Piano 2014-2018, che ha tra i suoi macro obiettivi la riduzione del carico prevenibile ed evitabile di morbosità, mortalità e disabilità delle malattie non trasmissibili, tra i cui determinanti vi sono anche i fattori ambientali, e la riduzione delle esposizioni ambientali potenzialmente dannose per la salute. Il raggiungimento di questi macro obiettivi prevede la definizione di accordi intersettoriali a livello nazionale e regionale per la salute in tutte le politiche, l'implementazione di strumenti che facilitino l'integrazione fra istituzioni ed enti che si occupano di ambiente e salute al fine di supportare le Amministrazioni nella valutazione degli impatti sulla salute. Quasi tutte le Regioni nell'ambito dei Piani Regionali/ Provinciali della Prevenzione hanno attivato programmi volti a ridurre

le esposizioni ambientali potenzialmente dannose per la salute.

Inoltre, nel giugno 2015 è stato siglato un protocollo d'intesa tra il Ministero della Salute e l'Associazione Rete italiana città sane OMS, al fine di promuovere l'integrazione tra i progetti e i programmi dei Comuni aderenti alla Rete con quelli delle aziende sanitarie e degli altri attori del territorio, per realizzare iniziative condivise per la promozione della salute e lo sviluppo di condizioni ambientali che favoriscano sani stili di vita.

Vi è poi un'intensa attività di partecipazione a tavoli tecnici congiunti Ministero della Salute e Ministero dell'Ambiente, cui partecipano ricercatori degli enti nazionali ambientali e sanitari quali ISS ed ISPRA nonché le Agenzie regionali per l'ambiente, per affrontare in modo integrato queste tematiche. Tra questi citiamo il tavolo per la revisione del DLgs 152/2006, ovvero il Testo Unico sull'ambiente.



Inquinamento ambientale e fertilità maschile

Inquinanti ambientali e stili di vita scorretti contribuiscono al declino della fertilità maschile nei paesi industrializzati, misurare gli effetti genomici e epigenetici nel gamete maschile è importante per poter attuare le politiche di prevenzione

DOI 10.12910/EAI2017-042

di **Giorgio Leter, Francesca Pacchierotti, Eugenia Cordelli e Claudia Consales**, ENEA

Dedichiamo questo articolo al nostro amico e collega Marcello Spanò, pioniere delle ricerche condotte all'ENEA sull'impatto dei fattori ambientali sulla fertilità maschile

Secondo le più recenti stime dell'ONU si prevede che la popolazione mondiale arriverà a 9,7 miliardi di individui nel 2050, eppure insieme a questo dato anche il numero di persone infertili è aumentato negli ultimi 50 anni e le stime danno questo dato in crescita. Attualmente, secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), il 15-20 % delle coppie nei paesi industrializzati ha problemi nel concepimento di figli. Le cause che contribuiscono a determinare tale percentuale sono varie: oltre a fattori genetici, l'inquinamento ambientale, lo stile di vita e le condizioni socio-economiche sembrano essere quelle prevalenti. L'infertilità di coppia è attribuita nel 35% circa dei casi al partner femminile, nel 30% al partner maschile; nel 20% dei casi si rilevano problemi in ambedue i partner e nel 15% dei casi l'origine rimane sconosciuta (infertilità idiopatica). Una recente meta-analisi dei dati sulla conta spermatica di oltre 40.000 individui di paesi occidentali indica una riduzione di oltre il 50 % tra il 1973 e il 2011 [1], confermando con grande autorevolezza il trend precedentemente osservato.

Per alcuni aspetti l'infertilità maschile presenta alcune caratteristiche peculiari, proprie della genesi e dello sviluppo dell'apparato riproduttivo maschile che lo rendono suscettibile all'azione di inquinanti ambientali e di quelli derivanti da scorretti stili di vita quali il tabagismo e l'alcolismo. Oggi, numerosi studi sperimentali ed epidemiologici hanno dimostrato in modo solido che il fumo ha effetti nocivi sulla salute riproduttiva maschile agendo a diversi livelli, dalla riduzione del potenziale di fertilità alla induzione e trasmissione di alterazioni ereditarie [2].

Lo sviluppo del gamete maschile,

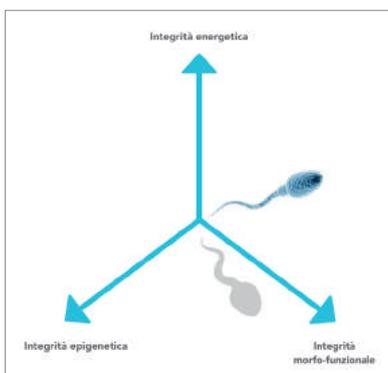


Fig. 1 Le tre dimensioni dell'integrità dello spermatozoo

lo spermatozoo, è regolato dagli ormoni del sistema endocrino, di cui anche gli organi riproduttivi fanno parte, attraverso il complesso processo della spermatogenesi che ha inizio all'età puberale e continua per il resto della vita della persona. Negli ultimi decenni, alcune sostanze chimiche di uso industriale (plasticanti, biocidi, metalli pesanti e altre) sono state disperse nell'ambiente e costituiscono una fonte di esposizione per l'uomo e gli ecosistemi. Tra queste sostanze alcune si comportano come ormoni esogeni e interferiscono con il sistema endocrino già a partire dallo sviluppo fetale e postnatale e successivamente, nell'omeostasi della fisiologia ormonale dell'individuo adulto. Queste sostanze sono state definite interferenti endocrini (EDC dall'acronimo inglese). Malgrado l'utilizzo di alcune di queste, come il poli-cloro-bifenile (PCB), il dicloro-difenil-tricloroesano (DDT) e il bisfenolo-A (BPA) siano state bandite in molti paesi già da diversi anni, concentrazioni rilevabili sono tuttora presenti nell'ambiente e all'interno degli organismi, tra i quali l'uomo, poiché tali sostanze tendono ad accumularsi nei lipidi corporei. Studi di laboratorio con-

dotti su modelli cellulari e animali hanno evidenziato che l'esposizione a questa classe di composti induce alterazioni delle funzioni tiroidea e riproduttiva, con diminuita sopravvivenza dei nati e alterazioni nello sviluppo. Anche studi epidemiologici su popolazioni umane hanno rilevato un'associazione tra i livelli di questi inquinanti e una riduzione della fertilità.

L'Unione Europea ha selezionato 564 sostanze sospettate di essere interferenti endocrini. Di queste, 147 presentano una elevata persistenza ambientale o sono prodotte in grandi volumi. Al momento, di queste, 66 sono state accertate agire come interferenti endocrini (categoria 1) e per altre 52 sono state ottenute evidenze in tal senso anche se non conclusive (categoria 2) [3].

Per la valutazione dell'impatto ambientale sulla salute riproduttiva, tre sono le dimensioni che devono essere prese in considerazione: quella della tossicità con un effetto sul numero e sulla capacità fecondante degli spermatozoi, quella della genotossicità con un effetto sulla qualità dell'informazione genetica trasmessa alla prole e quella delle alterazioni epigenetiche, con effetti potenziali sia sulla fertilità che sulla insorgenza di patologie nella prole (Figura 1).

Origine delle alterazioni genetiche nel corso del differenziamento germinale maschile

Lo spermatozoo è il prodotto finale di un processo complesso e delicato chiamato spermatogenesi che porta da una cellula proliferante relativamente indifferenziata, lo spermatogonio, ad una cellula aploide, estremamente specializza-

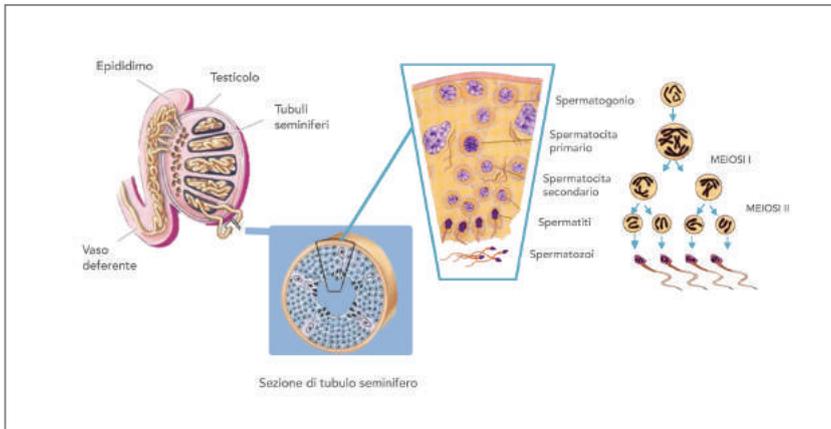


Fig. 2A Il differenziamento germinale maschile avviene all'interno dei tubuli seminiferi nel testicolo. Le cellule man mano che maturano migrano verso il lume del tubulo dal quale sono traslocate all'epididimo. La cellula spermatogoniale dà origine agli spermatociti da ciascuno dei quali, attraverso la meiosi e il successivo differenziamento (spermiogenesi) derivano 4 spermatozoi

ta, dalla morfologia aerodinamica, capace di muoversi e fecondare l'ovocita (Figura 2).

Durante questo processo, che nell'uomo dura più di 70 giorni, gli spermatogoni vanno incontro a varie divisioni mitotiche differenziandosi poi, in parte, in spermatociti primari che dopo due successive divisioni meiotiche daranno origine agli spermatidi rotondi. Da ogni spermatocita si otterranno quattro spermatidi rotondi che inizieranno la fase di spermiogenesi. La maturazione post-meiotica comporta profondi cambiamenti morfologici, lo spermatide perde infatti gran parte del citoplasma, assume una forma affusolata e si forma il flagello. Contemporaneamente, le proteine associate al DNA vengono sostituite rendendo la cromatina estremamente compatta. L'intero processo è finemente regolato e la diversità di tipi cellulari della spermatogenesi si riflette in una diversa suscettibilità all'esposizione ad agenti nocivi. La deregolazione del processo può avere effetti negativi sulla quantità

e sulla qualità del prodotto finale, lo spermatozoo, con un conseguente impatto sulla fertilità maschile. Va inoltre considerato, che, poiché lo spermatozoo è deputato alla trasmissione dei caratteri ereditari maschili da una generazione alla successiva, un possibile danno genetico può avere un impatto rilevante sulla fertilità e sulla salute della prole. La fase replicativa degli spermatogoni è potenzialmente soggetta ad errori nella duplicazione del DNA, in questa fase quindi gli spermatogoni sono particolarmente sensibili

all'induzione di mutazioni geniche *de novo* mentre durante la meiosi, quando avviene la ricombinazione tra cromosomi omologhi, sono più frequenti le alterazioni cromosomiche. Uno stadio estremamente sensibile al danno genomico è costituito dalla lunga fase di maturazione post-meiotica. Durante questa fase infatti, l'eventuale presenza di elevati livelli di specie chimiche reattive dell'ossigeno (ROS) di natura endogena ed esogena ed il processo di sostituzione delle proteine nucleari, che implica l'introduzione di rotture della doppia elica di DNA, concorrono a favorire la formazione di rotture nella molecola di DNA.

A causa della progressiva perdita delle funzioni enzimatiche di riparazione del DNA, queste rotture non possono essere riparate efficacemente, pertanto le lesioni indotte in queste ultime fasi della spermatogenesi possono persistere fino alla fecondazione causando alterazioni genetiche nello zigote.

Oggi un crescente numero di dati conferma che se le alterazioni del numero cromosomico insorgono molto più frequentemente nel corso della meiosi femminile, le aberrazioni cromosomiche strutturali e le mutazioni geniche sembrano avere

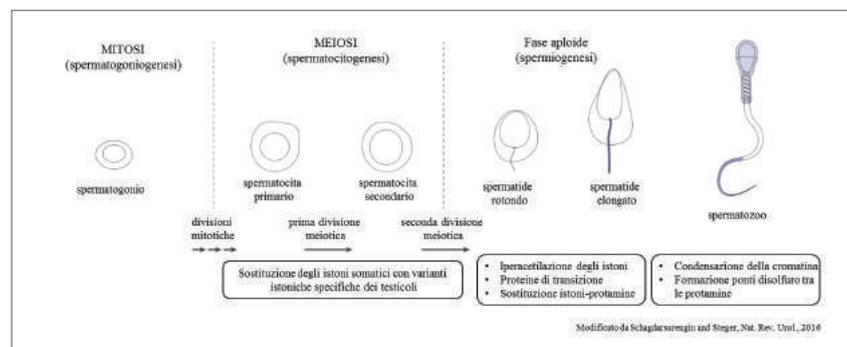


Fig. 2B Durante la meiosi, la maggior parte degli istoni somatici sono sostituiti con le varianti tipiche delle cellule del testicolo. Durante la spermiogenesi, si ha una completa riorganizzazione e condensazione della cromatina, grazie anche alla sostituzione degli istoni con le protamine

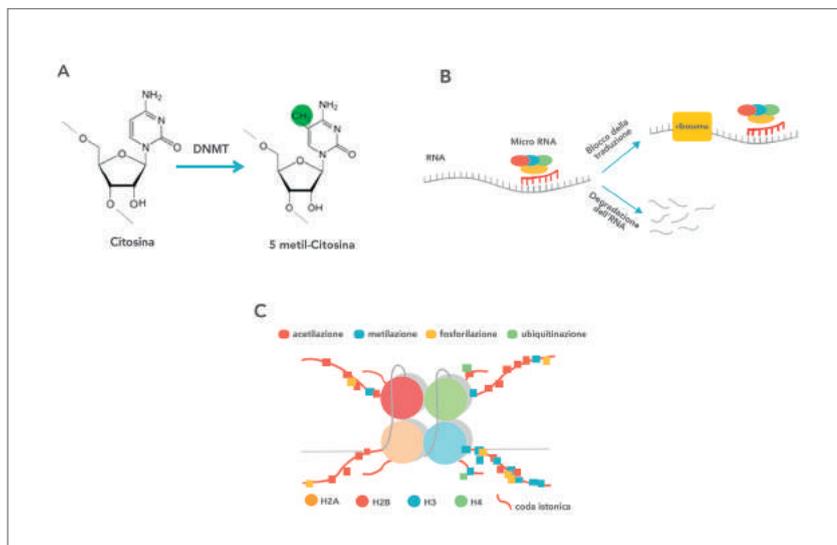


Fig. 3 Principali meccanismi di controllo epigenetico: (A) Metilazione DNA; (B) microRNA; (C) Modifiche istoniche

una prevalente origine paterna. Inoltre è stato osservato che mentre la frequenza di alterazioni del numero cromosomico nella progenie è fortemente dipendente dall'età materna, la frequenza di mutazione aumenta invece con l'età paterna.

A partire dagli anni 60 del XX secolo, numerosi studi sui roditori di laboratorio hanno dimostrato e caratterizzato l'induzione di alterazioni genetiche nel sistema germinale maschile dopo esposizione a radiazioni ionizzanti e molte sostanze chimiche, cui l'uomo può essere esposto in ambienti di vita e di lavoro. In seguito, l'applicazione di nuove tecniche di analisi cellulare e molecolare allo spermatozoo umano ha permesso di confermare alcuni di questi risultati sull'uomo contribuendo in tal modo a raffinare le stime di rischio.

Epigenetica dello spermatozoo ed eredità transgenerazionale

Il termine epigenetica (dal greco επί, epì = «sopra» e γεννητικός,

γεννητικός = «relativo all'eredità familiare») è stato utilizzato per la prima volta nel 1940 dallo studioso scozzese Conrad Waddington per descrivere quei «processi/fattori molecolari intorno al DNA che regolano l'attività genomica indipendente-

mente dalla sequenza del DNA e che sono mitoticamente stabili». In altre parole, con il termine epigenetica ci si riferisce a tutti quei cambiamenti che influenzano l'espressione genica, cioè il fenotipo, senza alterare la sequenza nucleotidica dei geni, cioè il genotipo. Caratteristica dei fenomeni epigenetici è quella di essere fondamentalmente stabili da una generazione cellulare alla successiva, ma nello stesso tempo di rispondere a influenze ambientali con una plasticità molto maggiore di quella connaturata alla sequenza del DNA. Esistono tre meccanismi principali attraverso cui la cellula attua i controlli epigenetici dell'espressione genica: la metilazione del DNA, l'utilizzo di piccole molecole di RNA non codificanti, tra cui i cosiddetti microRNA e le modifiche degli istoni (Figura 3).

La metilazione del DNA consiste nel legame di un gruppo metilico al carbonio 5 di una Citosina posta accanto ad una guanina (CpG) ad opera dell'enzima DNA metil-



transferasi (DNMT) e generalmente comporta l'inattivazione dell'espressione genica.

I microRNA sono RNA a singolo filamento lunghi circa 20 nucleotidi coinvolti nella regolazione dell'espressione genica a livello trascrizionale e post-trascrizionale. Essi inibiscono l'espressione perché interagiscono direttamente con le molecole di RNA messaggero impedendone la traduzione oppure inducendone la loro degradazione.

Gli istoni sono proteine basiche

differenziamento germinale maschile. Durante la spermatogenesi le cellule germinali subiscono diverse modifiche epigenetiche. Gli spermatozoi contengono un corredo di informazioni epigenetiche, a livello della metilazione del DNA, del contenuto di RNA non codificanti e delle modificazioni della frazione istonica residua, essenziale per determinare sia la loro stessa funzionalità che il corretto sviluppo delle prime fasi embrionali. Alterazioni nell'epigenoma dello spermatozoo potrebbero

denza, è fortemente suscettibile ad influenze ambientali, tra cui si annoverano, oltre all'esposizione a vari tipi di sostanze, quali gli inquinanti xenobiotici, anche il cibo, lo stress, il fumo, eccetera (Figura 4).

Per questa ragione, lo stile di vita del padre può avere ripercussioni sullo stato di salute di figli e nipoti. Numerosi studi, infatti, hanno dimostrato, ad esempio, che l'obesità induce nei maschi un cambiamento della metilazione del DNA e della composizione dei microRNA delle cellule testicolari che ha un effetto diretto sulla composizione del grasso dei discendenti (fino alla seconda generazione), rendendo questi individui anche maggiormente predisposti all'insorgenza del diabete. Ancora, è stato dimostrato che se nel periodo dell'accoppiamento i topi maschi sono sottoposti ad una dieta priva di folati, che sono i principali fornitori di gruppi metilici e sono presenti in alimenti quali verdure a foglia verde, arance, fragole, legumi, aumenta in maniera statisticamente significativa il numero degli aborti e di cuccioli con malformazioni, perché il DNA di questi ultimi presenta delle alterazioni nei livelli di metilazione di alcuni geni coinvolti nello sviluppo.

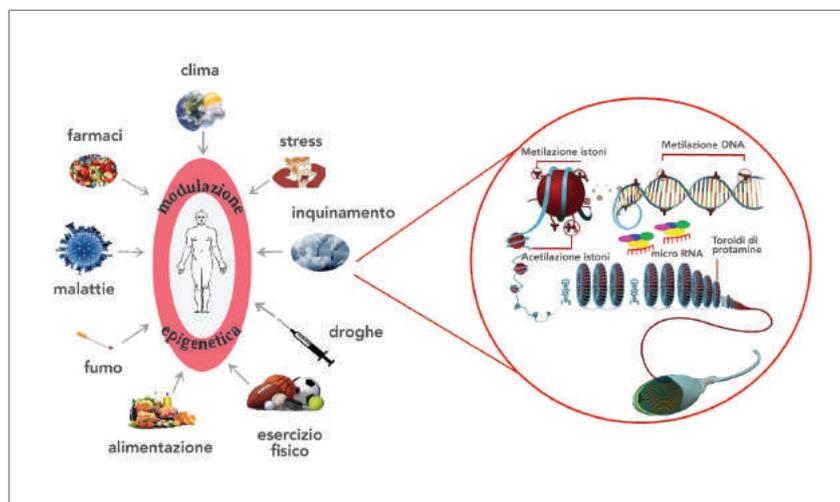


Fig. 4 Nell'uomo lo stile di vita modifica l'epigenoma dello spermatozoo

che, legando il DNA, costituiscono la componente principale della cromatina. Modifiche delle loro code N-terminali, quali la fosforilazione, la metilazione, l'acetilazione e l'ubiquitinazione, determinano una struttura rilassata o compatta della cromatina che favorisce o meno l'espressione genica.

L'epigenetica è fondamentale durante lo sviluppo embrionale, dal momento che la maggior parte dei processi di differenziamento cellulare si basa su fenomeni epigenetici, e svolge un ruolo chiave anche nel

spiegare alcuni di casi di infertilità idiopatica, in cui sembra non esserci alcuna causa evidente per la mancanza di procreazione.

Le modifiche dell'epigenoma dello spermatozoo, oltre a poter comportare problemi di fertilità, possono essere trasmesse alla progenie, diventando, quindi, vere e proprie mutazioni (epimutazioni). Studi sperimentali suggeriscono che queste epimutazioni possano avere conseguenze soprattutto a livello neuro-comportamentale e metabolico.

L'epigenoma, come detto in prece-

Ambiente e fertilità maschile: la ricerca nei laboratori dell'ENEA

L'ENEA negli ultimi 25 anni ha partecipato a diversi studi internazionali che hanno avuto per oggetto la valutazione degli effetti degli inquinanti ambientali sulla salute riproduttiva maschile e in particolare il loro impatto su un eventuale danno al DNA e alla cromatina dello spermatozoo. Nel corso degli anni, all'iniziale valutazione dell'integrità genetica si è aggiunta la dimensione

epigenetica. Tali studi, sia di carattere sperimentale che di epidemiologia umana hanno contribuito a incrementare le conoscenze sul rischio che gli inquinanti ambientali hanno sulla salute riproduttiva.

L'ultimo progetto in ordine di tempo, il progetto europeo (CLEAR) [4, 5], appena concluso, ha preso in esame alcuni composti della classe dei perfluorurati (PFOS e PFOA), utilizzati nei rivestimenti idrorepellenti e an-

timacchia, nei rivestimenti resistenti all'olio per prodotti di carta per uso alimentare, nelle schiume antincendio, nelle vernici. Lo studio ha riguardato una coorte di circa 600 europei che vivono in tre aree diverse del continente. Nei laboratori dell'E-NEA sono stati analizzati marcatori di integrità strutturale della cromatina spermatica e i livelli di metilazione globale del DNA dello spermatozoo. Lo studio, tra i primi a valutare

possibili associazioni tra esposizioni a contaminanti ambientali e metilazione del DNA spermatico, non ha messo in evidenza un effetto dell'esposizione ai composti in esame, ma ha dimostrato variazioni geografiche significative dei marcatori esaminati, suggerendo la necessità di ulteriori indagini per approfondirne le cause.

*Per saperne di più:
giorgio.leter@enea.it*

BIBLIOGRAFIA

1. H. Levine, N Jørgensen, A. Martino-Andrade, J. Mendiola, D. Weksler-Derri, I. Mindlis, R. Pinotti, and S.H. Swan Temporal trends in sperm count: a systematic review and meta-regression analysis, *Hum Reprod Update*. pp 1-14, 2017
2. MA. Beal, CL Yauk, F Marchetti. From sperm to offspring, Assessing the heritable genetic consequences of paternal smoking and potential public health impacts. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 773:26-50, 2017
3. European Commission, Endocrine Disruptors, Which substances are of concern? http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/strategy/substances_en.htm
4. G. Leter et al., Exposure to Perfluoroalkyl Substances and Sperm DNA Global Methylation in Arctic and European Populations. *Environ and Mol Mutagen* 55:591-600, 2014
5. C. Consales et al., Exposure to persistent organic pollutants and sperm DNA methylation changes in Arctic and European populations. *Environ Mol Mutagen*. 57:200-9, 2016



Alimenti funzionali: valorizzazione della risorsa e caratterizzazione nutraceutica

Un alimento è «funzionale» quando, oltre i normali effetti nutrizionali, produce effetti positivi su una o più funzioni specifiche dell'organismo, determina il miglioramento dello stato di salute, riduce il rischio di malattia, favorendo il benessere individuale

DOI 10.12910/EAI2017-043

di Barbara Benassi, Silvia Procacci, Chiara Santi, Francesca Pacchierotti e Loretta Bacchetta, ENEA

L'attenzione della Ricerca Scientifica, della Filiera Agroalimentare e della Salute Pubblica è da lungo tempo rivolta al cibo funzionale, risorsa naturale e facilmente disponibile, in grado di garantire benefici effetti sulla salute umana attraverso la dieta quotidiana. Il forte interesse dei consumatori per il rapporto tra alimentazione e salute ha favorito la comparsa di numerosi prodotti alimentari con proprietà benefiche; è emersa di conseguenza la necessità di regolamentarne la produzione e commercializzazione mediante la definizione di standard e linee guida. Il termine "alimento funzionale" è nato in Giappone negli anni 80; in tale contesto, i suddetti alimenti sono stati classificati sostanzialmente in due gruppi: utilizzabili per la tutela della salute e indicati per la riduzione del rischio di insorgenza di patologie.

Anche negli Stati Uniti, nel 1993 la Food and Drug Administration (FDA) ha approvato, sulla base di evidenze scientifiche, gli *health claims* relativi alla capacità di riduzione del rischio di malattia di determinati alimenti.

In Europa, nell'ambito del Progetto Fufose (Functional Food Science in Europe) del 1999, l'EFUIC (European Food Information Council) ha elaborato una definizione di alimento funzionale ancora oggi ritenuta esaustiva: *Un alimento può essere considerato «funzionale» se dimostra in maniera soddisfacente di avere effetti positivi su una o più funzioni specifiche dell'organismo, che vadano oltre gli effetti nutrizionali normali, in modo tale che sia rilevante per il miglioramento dello stato di salute e di benessere e/o per la riduzione del rischio di malattia. Gli alimenti funzionali devono comunque restare*

«alimenti» e dimostrare la loro efficacia nelle quantità normalmente consumate nella dieta. Gli alimenti funzionali non sono pillole o pastiglie, ma prodotti che rientrano nelle normali abitudini alimentari.

Il Regolamento CE n. 1924/2006 e successive modifiche e il Regolamento UE n. 432/2012 sono stati redatti per disciplinare l'utilizzo in etichetta delle indicazioni salutistiche e nutrizionali approvate, previa evidenza scientifica, dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA).

L'EFSA è chiamato a esprimere il proprio Parere nell'autorizzazione delle richieste di *health claims* per le diverse molecole bioattive, i Pareri dell'EFSA sono contenuti nel Registro Europeo (http://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/register/public/?event=search)

pubblicato on line nel maggio 2012. Tale registro è in continua evoluzione, in quanto viene aggiornato ogni qualvolta l'Autorità esprima nuovi pareri favorevoli o contrari.

Rientrano nella categoria dei *functional foods* cibi che contengono determinati minerali, vitamine, polifenoli, acidi grassi o fibre alimentari, ma anche alimenti addizionati con sostanze biologicamente attive. Tali molecole possono essere classificate in base al loro ruolo funzionale nella prevenzione di diverse malattie e/o favorendo il benessere individuale [1].

La caratterizzazione molecolare dei cibi funzionali per la prevenzione delle patologie croniche

L'alimentazione rappresenta pertanto una componente imprescindibile nell'ambito delle strategie atte a proteggere l'organismo nei confronti di

danni indotti da stile di vita errati e dall'esposizione a stress ambientali, due tra i principali fattori di rischio alla base dell'insorgenza di patologie cronico-degenerative. Diverse componenti svolgono un ruolo chiave nell'eziopatogenesi di queste malattie, ma l'eccesso di radicali liberi dell'ossigeno (ROS) (stress ossidativo) associato a un cronico stato infiammatorio, e le variazioni epigenetiche nei tessuti bersaglio rappresentano due meccanismi molecolari comuni a numerosi stati degenerativi tra cui malattie cardiovascolari, patologie neuro-degenerative e neoplastiche. Agendo a livello di questi due meccanismi, il cibo può giocare un ruolo determinante nella protezione e nella prevenzione di patologie, anche e soprattutto se integrato in un corretto stile alimentare a partire dalla giovane età dell'individuo. Numerosi studi hanno infatti dimostrato come le variazioni epigenetiche indotte dall'ambiente in senso lato durante l'infanzia, comprese le abitudini alimentari, siano determinanti nel caratterizzare la predisposizione, in età adulta, a specifiche malattie degenerative, quali ad esempio l'Alzheimer.

Le modificazioni epigenetiche sono variazioni reversibili ed ereditarie dell'espressione genica che non implicano cambiamenti nella sequenza del DNA. Esse includono metilazione del DNA, modificazioni post-traduzionali a carico degli istoni, e regolazione dell'espressione genica via RNA non codificanti, tra cui i microRNA [2]. L'epigenetica gioca pertanto un ruolo fondamentale nel mantenimento della stabilità genomica, e assicura una pronta risposta a stimoli sia fisiologici che ambientali. Diversi studi sperimentali hanno dimostrato come stress ossidativo e meccanismi epigenetici possano agi-

re in sinergia. Lo stress ossidativo è in grado di intervenire nei meccanismi di silenziamento genico mediato dai microRNA, agendo sia a monte (biogenesi dei microRNA), che a valle della loro azione, interferendo con l'attività del complesso proteico RISC (*RNA-induced silencing complex*). Ad esempio, l'oncogene RAS induce un processo di senescenza precoce in fibroblasti umani stimolando la produzione di ROS che a loro volta regolano la proteina AGO2 (Argonaute 2), una componente fondamentale del complesso RISC. Allo stesso tempo, i microRNA possono modulare l'espressione di geni coinvolti nella produzione di ROS, contribuendo all'amplificazione dello stress ossidativo e dei danni ossidativi da esso indotti. Anche nell'ischemia cerebrale è stata documentato il *cross-talk* tra disequilibrio redox a livello mitocondriale e alterata attività degli enzimi che controllano la struttura cromatinica attraverso modificazioni degli istoni e metilazione del DNA, a ulteriore testimonianza dell'attiva "collaborazione" molecolare tra stato redox e plasticità epigenetica.

Sulla base di questa attività sinergica, numerosi studi hanno caratterizzato le componenti attive degli alimenti dal punto di vista funzionale, in termini sia di proprietà antiossidanti/anti-infiammatorie e, più recentemente, di modulatori epigenetici. Ne sono un chiaro esempio i polifenoli, una famiglia di metaboliti secondari presenti in foglie, bacche e frutti di numerose piante quali tè verde, fave del cacao, uva e frutta secca. Ad essi sono state attribuite un ampio spettro di proprietà biologiche non solo anti-ossidanti/anti-infiammatorie ma anche anti-virali/anti-batteriche, nonché anti-trombogeniche e anti-aterogeniche che li hanno resi dei componenti chiave negli studi

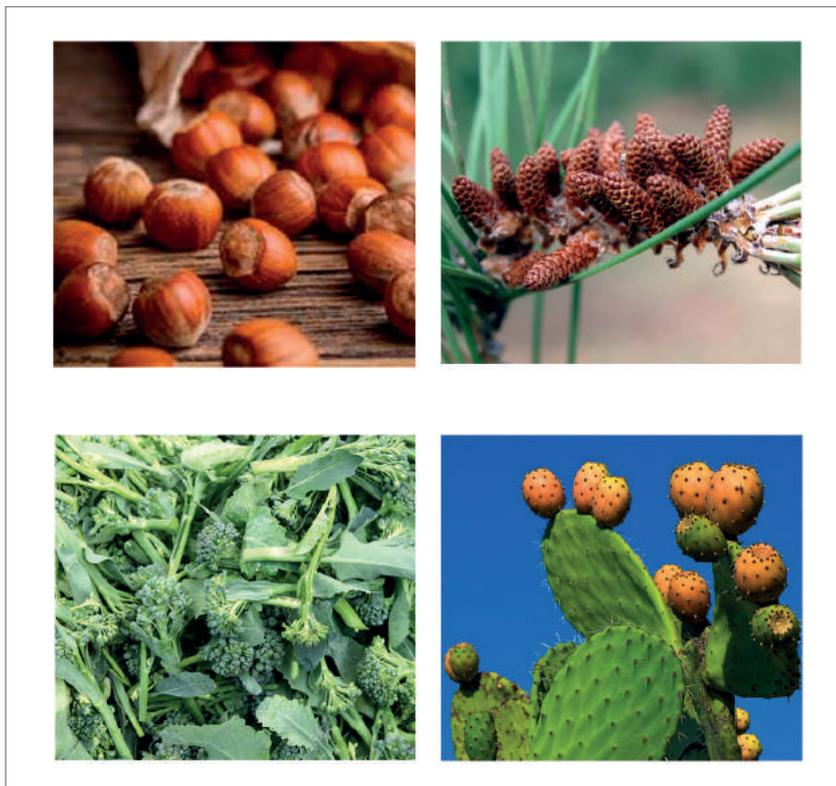


Fig. 1 Specie in studio nei programmi di caratterizzazione nutraceutica presso il Centro Ricerche Casaccia dell'ENEA

epidemiologici sulla prevenzione di patologie cronico-degenerative, soprattutto cardiovascolari. A tal proposito gli studi sulla dieta mediterranea – un regime alimentare ricco di fonti nobili di polifenoli quali olio extra vergine di oliva, legumi, cereali oltre a frutta e verdura – hanno evidenziato il ruolo protettivo di tale stile alimentare nei confronti di patologie infiammatorie croniche e dell'insorgenza delle placche aterosclerotiche, e documentato un potente effetto *anti-aging*. Tale ruolo protettivo è stato recentemente messo in relazione con la capacità dei polifenoli di modulare la macchina epigenetica: molecole polifenoliche quali quercetina, epigallocatechina, e soprattutto curcumina e resveratrolo, sono in grado di agire

a livello della cromatina istonica e della metilazione del DNA, interferendo o stimolando l'attività degli enzimi coinvolti nel rimodellamento cromatinico e/o nel trasferimento di gruppi metilici alla citosina (DNA metil-transferasi). È stata inoltre documentata la capacità di queste molecole di regolare l'espressione e l'attività di specifici microRNA coinvolti nella patogenesi delle malattie cardiovascolari e cronico-degenerative, aprendo un nuovo scenario nella definizione della capacità funzionale degli alimenti ricchi di polifenoli.

Categorie nutraceutiche e funzionali

La presenza e la disponibilità delle sostanze fitochimiche negli alimenti



è funzione di alcuni fattori di criticità della filiera produttiva che possiamo distinguere in: fattori intrinseci (con riferimento alla variabilità genetica intraspecifica della specie) e fattori edafici (che riguardano l'effetto di condizioni pedo-climatiche e processi tecnologici o di trasformazione subito dai prodotti vegetali, artigianali o industriali). Alcuni di questi trattamenti possono essere responsabili di diminuzioni, incrementi o cambiamenti nel contenuto e nell'attività delle biomolecole funzionali espresse nel genotipo.

L'esperienza pluriennale di ENEA-Laboratorio BIOPRO nella caratterizzazione biochimica e molecolare delle nocciole (*Corylus avellana*) (Figura 1), tipica produzione del Mediterraneo il cui uso è documentato fin dal paleolitico, rappresenta un valido caso studio. Tra le differenti specie di frutta secca, le nocciole sono caratterizzate da un elevato contenuto in acidi grassi insaturi (circa il 60% costituito prevalentemente da acido oleico 70-80%) vitamina E, α -tocoferolo (potente *scavenger*), e folati (113 $\mu\text{g}/100\text{gr}$), fattori chiave nella metilazione del DNA. Lo studio di 75 cultivars presenti nelle collezioni Europee, ha permesso di analizzare la variabilità genetica per questi caratteri, e di sviluppare un metodo chemiometrico basato sull'analisi fattoriale e cluster, in grado di identificare genotipi ad alto contenuto di oleico e α -tocoferolo; tale studio ha anche evidenziato la variabilità dell'espressione del gene FAD2 e dell'attività della delta-desaturasi coinvolti nel processo di irrancidimento. In aggiunta agli antiossidanti endogeni, è noto che fitomolecole, come i polifenoli, contenuti negli alimenti possono contribuire all'attività an-

Fasanese	104.57 b
Cima di rapa 120	3.14 g
Cima di rapa 90	53.68 cd
Cima di rapa 40	0,59 f
Foglie d'Ulivo	37.81 de
Fasano Cima Grande (40gg)	1.34 g
Fasano Cima Grande (60gg)	15.06 efg
Natalina Cima Grande (90gg)	8.66 fg
Marzatica sel. Murgie (120gg)	252.57 a
Broccoletto Anguillara	3.86 g
Sessantina	19.48 ef
Quarantina Cima grossa	5.28 g
Novantina	14.43 efg
Cima grossa ecotipo Altamura	70.10 c

Tab. 1. Contenuto in sulforafano ($\mu\text{g}/\text{g}$ peso secco) in ecotipi locali di *Brassica rapa* L.

tiossidante sia come composti attivi redox che come *scavenger*, in grado di neutralizzare radicali liberi o di attivare l'espressione genica, anche via regolazione epigenetica, di antiossidanti endogeni. Nelle nocciole abbiamo identificato 18 composti fenolici di cui 10 flavonoidi e 7 fenolici e 1 diidrocalcone che variano in funzione della cultivars e come conseguenza delle condizioni pedo-climatiche e delle tecniche di coltivazione. Un componente chiave è l'(-)-epigallocatechina-3-gallate, capace di interagire con l'attività enzimatica della DNA metil-transferasi. Nei nostri studi abbiamo rilevato come una parte importante dei polifenoli sia contenuta nel perisperma, il sottoprodotto della tecnica di tostatura;

la nocciola fresca ha pertanto una maggiore capacità antiossidante rispetto al prodotto tostato. Altri componenti di interesse funzionale nelle nocciole sono rappresentati dai minerali, per il ruolo in diverse attività metaboliche, e dalle proteine, come la cardio-protettiva arginina; le nostre attività di ricerca condotte su 92 varietà hanno dimostrato l'ampia variabilità del germoplasma analizzato: il contenuto di potassio è variato da 440,5 a 828,4 su mg 100g di peso secco (ps); il calcio da 238,8 a 552,0 mg su 100g ps; il fosforo da 172,0 a 460,9 mg su 100 g ps; il magnesio da 121,3 a 211,0 mg su 100g ps mentre il contenuto proteico è variato da 8 a 19,7 mg/100g DW con effetto significativo degli anni di coltivazio-

ne e delle aree di produzione [3]. Sulla base di queste conoscenze, e dei diversi studi che evidenziano il ruolo funzionale delle nocciole a carico del profilo lipidico ematico umano, è stato condotto, in ENEA-Casaccia in collaborazione con l'Università di Tor Vergata - Dipartimento di Biomedicina e Prevenzione, uno studio multidisciplinare finanziato dal Progetto Bioservice della Regione Lazio (LR 13/2008 PROT.FILAS-RU-2014-1168-2017) in 24 volontari sani.

Il disegno sperimentale ha previsto una dieta arricchita con nocciole (40 g al giorno) per sei settimane, e un monitoraggio dell'assetto ematico al tempo iniziale (T0), alla fine della dieta (T1) e dopo sei settimane dalla dieta stessa (T2) su variabili di routine, per stabilire lo stato di salute generale [4]. Il punto di forza del lavoro è stato infatti la valutazione di un effetto complessivo che mira ad una visione olistica della problematica dieta/salute. I risultati hanno confermato l'effetto di molecole bioattive del nocciolo sul profilo lipidico dei volontari con una riduzione significativa del colesterolo totale e dell'LDL ed aumento del rapporto HDL/LDL (Figura 2).

Sono stati inoltre scoperti altri effetti del tutto innovativi, quali la diminu-

zione significativa dell'acido urico e della creatinemia; i risultati dopo 6 settimane dalla dieta arricchita hanno dimostrato la reversibilità degli effetti benefici verso i valori iniziali. Inoltre, benché l'analisi statistica non abbia evidenziato marcate differenze significative, questo studio ha messo in evidenza come i benefici sulle LDL varino a seconda della condizione iniziale: nelle donne, in chi è più giovane e in chi parte con un valore di LDL minore di 130, i benefici sono più marcati [4].

Studi analoghi sono stati portati avanti in altre specie di frutta secca come il mandorlo (*Prunus dulci*), e sono in corso su pinolo (*Pinus pinea*); su altre specie come *Brassica rapa*, sono stati effettuati recuperi e valorizzazione del germoplasma locale con la determinazione del contenuto in sulforafano, molecola funzionale con proprietà antiinfiammatorie, antibatteriche e antitumorali (Tabella 1). Nei nostri laboratori è in corso lo studio su *Opuntia ficus indica* con molecole funzionali implicate in processi di detossificazione dell'organismo, con proprietà antiiperglicemiche e di riduzione del colesterolo (Figura 1).

Le piante spontanee edibili sono state oggetto di una progettualità in collaborazione con il CNR di Mon-

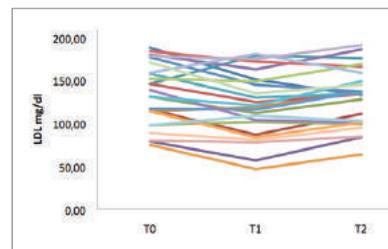


Fig. 2 Curva di tendenza dei valori di LDL misurati nell'arco di tempo sperimentale
Fonte: Santi et al., 2017

terondo-Istituto di Biologia Cellulare e Neurologia perché ritenute un prezioso componente della dieta tradizionale, salutare, un concentrato di biomolecole antiossidanti [5].

Conclusioni

I cibi funzionali rappresentano un mercato in continua evoluzione, un'opportunità per il settore agroalimentare. Il supporto finanziario alla ricerca di base, all'innovazione di processo e di prodotto sono fattori determinanti per una maggiore competitività dell'industria alimentare. Il link dei concetti 'salute, tecnologia e nutrizione' ai fini dello sviluppo di alimenti ad alta valenza nutraceutica, in filiere dedicate, è possibile se si promuove il continuo dialogo ed interazione tra specialisti del settore, consumatori, industria.

BIBLIOGRAFIA

1. Polito P, Procacci S, Brunori A, Vitali F (2013) Alimenti funzionali: quadro normativo, opportunità per l'industria agroalimentare e per la ricerca. Rapporto tecnico 2013 ENEA RT/14/ENEA
2. Benassi B, Flavin R, Marchionni L, Zanata S, Pan Y, Chowdhury D, et al. (2012) MYC is activated by USP2a-mediated modulation of microRNAs in prostate cancer. *Cancer Discov* 2(3):236-47
3. Bacchetta L, Rovira M, Tronci C, Aramini M, Drogoudi P, Silva AP, Solar A, Avanzato D, Botta R, Valentini N, Boccacci P (2015). A multidisciplinary approach to enhance the conservation and use of hazelnut genetic resources. *Genet Resour Crop Evol* 62:649–663
4. Santi C, Giorni A, Toriani Terenzi C, Altavista P, Bacchetta L (2017) Daily Hazelnut Intake Exerts Multiple Reversible Effects on Plasma Profile of Healthy Subjects. *Food and Nutrition Science* 8(6): 633-646
5. Bacchetta L, Visioli F, Cappelli G, Caruso E, Martin G, Nemeth E, Bacchetta G, Bedini G, Wezel A, van Asseldonk T, van Raamsdonk L, Mariani F, on behalf of the Eatwild Consortium (2016) A manifesto for the valorization of wild edible plants. *I J. of Ethnopharmacology* 191:180-187

Sorgenti e aspetti epidemiologici dell'inquinamento atmosferico in contesti urbani e industriali

L'inquinamento atmosferico rappresenta il più rilevante fattore di rischio ambientale. Nell'articolo una analisi della situazione italiana, con le principali sorgenti di inquinamento, l'andamento della qualità dell'aria e le conoscenze esistenti sugli effetti sanitari correlati

DOI 10.12910/EAI2017-044

di **Maria Eleonora Soggiu, Pietro Comba e Gaetano Settimo**, *Istituto Superiore di Sanità*; **Marina Mastrantonio e Raffaella Uccelli**, *ENEA*

Nel 2013 la IARC (International Agency for Research on Cancer) ha classificato l'inquinamento atmosferico *outdoor* cancerogeno per l'uomo (Gruppo 1) [1] e l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità), oltre a stimare 3 milioni di morti ad esso attribuibili nel 2012, ha valutato che nel 2014 il 92% della popolazione mondiale viveva ancora in aree con concentrazioni di inquinanti superiori a quelle raccomandate nelle *Air Quality Guidelines* dell'OMS.

Studi specifici condotti in Italia attribuiscono ai livelli di concentrazione di particolato sospeso (PM_{2,5}),

biossido di azoto (NO₂) e ozono (O₃) misurati nel 2010, rispettivamente 21.500, 12.000 e 2.000 morti premature, sollevando preoccupazione per le aree urbane, dove si concentra circa il 70% della popolazione. Importanti aree industriali, limitrofe alle aree urbane, aggravano ulteriormente l'esposizione della popolazione residente.

I risultati di numerosi studi sugli effetti sulla salute in seguito all'esposizione della popolazione ad inquinamento dell'aria, sollecitano la necessità di individuare con urgenza e mettere in atto efficaci azioni di riduzione del rischio, unitamente ad un riesame più generale della politi-

ca dell'Unione Europea (UE) in materia di controllo dell'inquinamento dell'aria.

Le sorgenti di inquinamento atmosferico

Nella maggior parte delle aree urbane il principale contributo all'inquinamento dell'aria è costituito dal traffico veicolare, con contributi ai livelli di concentrazioni di PM₁₀ che possono arrivare fino al 70% a Roma, al 62% a Milano, al 40% a Torino, al 46% a Bologna e al 20% a Genova. Infatti, in aree urbane come Genova, la presenza di importanti zone industriali,



che incidono per circa il 66% alle concentrazioni di PM_{10} misurate, abbassa la quota di PM_{10} attribuibile alle emissioni da traffico. Anche per gli ossidi di azoto (NO_x) il settore del trasporto rappresenta il principale contributo (circa il 50%). Va comunque sottolineato che le emissioni veicolari si sono fortemente ridotte negli anni: gli NO_x dal 1990 al 2012 sono diminuiti del 56%, il PM_{10} del 53% e il $PM_{2.5}$ del 57%. Presso l'ISS è attiva da oltre 40 anni una stazione di monitoraggio della qualità dell'aria dedicata alle attività di ricerca e attualmente inserita nella rete speciale delle stazioni italiane. La Figura 1 mostra l'andamento decrescente delle concentrazioni di PM_{10} , $PM_{2.5}$ e polveri ultrafini (PUF) misurate tra il 2002 ed il 2012, a ulteriore conferma dei trend decrescenti delle concentrazioni misurate dalle reti di qualità

dell'aria collocate nelle città italiane. Un contributo rilevante all'inquinamento dell'aria è dato dalle emissioni degli impianti alimentati a biomasse, che dal 1990 ad oggi sono cresciuti del 113%. Tale crescita, poco

controllata e favorita da incentivi economici dedicati agli impianti ad energie rinnovabili, è avvenuta principalmente nelle aree del nord Italia, dove si concentrano il 75% di tutti gli impianti a biomasse. In Lombardia,

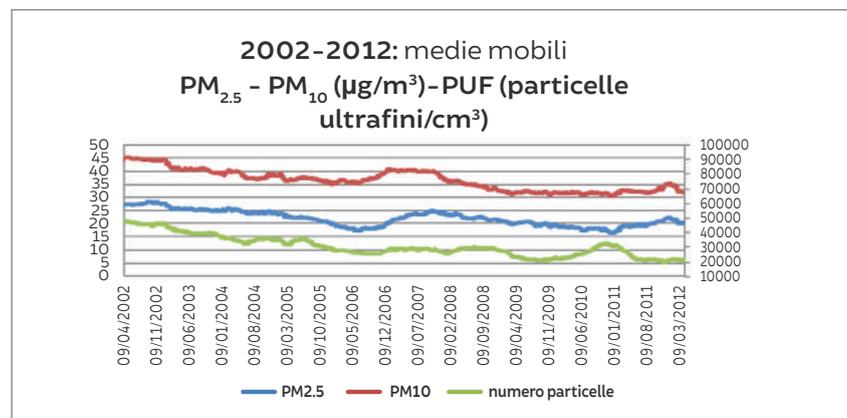


Fig. 1 Trend delle concentrazioni di $PM_{2.5}$, PM_{10} e particelle ultrafini (PUF) misurate presso la stazione di monitoraggio ISS
 Fonte: ISS-83 anni di Sanità Pubblica. Un racconto attraverso i poster
http://www.iss.it/binary/publ/cont/Volume_poster_parte_1.pdf

tra il 2005 ed il 2007, le emissioni di PM_{10} da combustione di biomasse hanno pesato per circa il 24% (legna e pellet), in Emilia Romagna per circa il 40%, ma i contributi più elevati si osservano nella pianura padana e nelle valli alpine in inverno. Tale scenario è conseguente anche ad una legislazione che consente agli impianti di potenza inferiore a 1 MW, di non dotarsi di quei sistemi di abbattimento richiesti invece agli impianti di maggiori dimensioni.

Lo sviluppo demografico e urbanistico che ha subito il territorio italiano, fa sì che grandi aree industriali sorgano oramai in prossimità dei centri urbani, aggiungendo il contributo specifico delle loro emissioni all'inquinamento dell'aria. Gli sviluppi tecnologici (es. migliori tecniche disponibili - BAT), insieme ad una più rigorosa legislazione, hanno permesso negli anni al settore industriale di ridurre fortemente il proprio impatto sulla componente aria. Dal 1990 al 2012 l'emissione di PM_{10} si è ridotta del 94% nell'industria di trasformazione e di produzione di energia. Discorso analogo per il $PM_{2,5}$, mentre per gli NO_x le emissioni si sono ridotte dell'84% (industria di trasformazione) e del 67% (produzione energia), arrivando a contribuire rispettivamente con il 9% e 10% sull'emissione totale.

Nel complesso, con l'unica eccezione del riscaldamento civile, ed in particolare degli impianti a biomasse, si registra un apprezzabile trend decrescente delle emissioni da parte di tutti i comparti. Le BAT applicate agli impianti industriali, l'uso di combustibili più "puliti" (basso contenuto di zolfo), la riduzione delle emissioni veicolari, la rete di monitoraggio della qualità dell'aria esistente in Italia ed i piani di risanamento adottati a livello locale e regionale sono fattori

che sinergicamente hanno consentito la riduzione dell'inquinamento. Va però segnalato che negli ultimi 3-4 anni si osservano alcune situazioni in controtendenza a causa, probabilmente, di una crisi economica che ha fortemente rallentato il *turn over* del parco veicolare (al nord Italia il parco veicolare è più moderno di quello

to il rischio sanitario più elevato. Va considerato, infatti, che il particolato (PM_{10} , $PM_{2,5}$) è costituito da un mix di sostanze e veicola tutta una serie di composti tossici e cancerogeni (diossine, furani, idrocarburi policiclici aromatici, metalli ecc.), variabili in funzione dello specifico contesto emissivo dell'area.

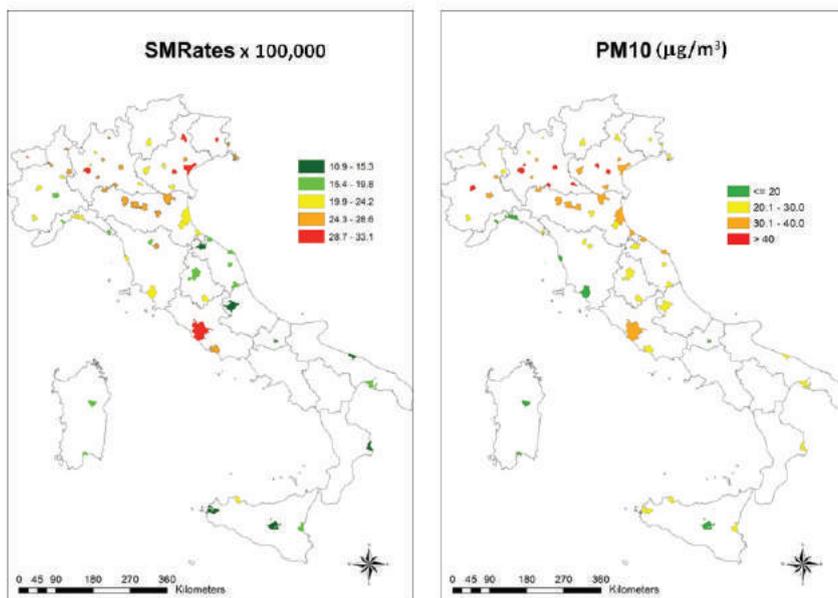


Fig. 2 Tassi di mortalità (SMRates) per tumore del polmone e concentrazioni misurate di PM_{10} in 64 Comuni capoluogo di provincia
Fonte: ENEA - Uccelli et al., 2016

presente al sud, dove ancora i veicoli più inquinanti Euro 0 e 1 rappresentano il 25-30%) e l'instaurarsi di condizioni climatiche spesso sfavorevoli alla dispersione degli inquinanti. I dati dell'ultimo *Air Quality Report for Europe* [2] evidenziano ancora un'alta esposizione della popolazione urbana a molti inquinanti quali il PM_{10} , $PM_{2,5}$, O_3 e Benzo[a]pirene. Ne consegue che, a tutela della salute pubblica, particolare attenzione debba essere posta ancora su alcuni macroinquinanti ma anche su specifici microinquinanti, a cui è associa-

L'inquinamento atmosferico e le aree urbane

L'ambiente urbano, come già detto, costituisce un contesto particolarmente critico per la salute dei cittadini, sia a causa della elevata concentrazione di fonti inquinanti, sia per il considerevole numero di individui esposti (72% della popolazione europea).

Numerosi studi epidemiologici hanno evidenziato l'impatto sanitario dell'inquinamento atmosferico in termini di effetti acuti - in



seguito a elevati picchi di concentrazione degli inquinanti - e cronici - per esposizioni prolungate a basse concentrazioni - fra cui l'induzione di tumori, malattie dell'apparato respiratorio e cardiovascolare. Fra i numerosi inquinanti presenti nell'aria urbana, il PM ha catalizzato da diverso tempo l'attenzione della comunità scientifica e delle autorità competenti sia per le sue proprietà cancerogene e tossiche, sia per la buona correlazione con altri inquinanti urbani, tanto che viene considerato un buon indicatore delle miscele presenti.

Tra i diversi studi epidemiologici recentemente condotti in Europa[3], ESCAPE (European Study of Cohorts for Air Pollution Effects) ha approfondito le conoscenze sugli effetti dell'inquinamento urbano sui nuovi nati e sulla incidenza delle malattie respiratorie, cardiovascolari e sulla mortalità o incidenza di tumori nelle popolazioni residenti; i due Progetti dell'OMS, REVIHAAP (Review of Evidence on Health Aspects of Air Pollution) ed HRAPIE (Health Risk of Air Pollution in Europe), hanno raccolto le evidenze

scientifiche sugli effetti indesiderati acuti e cronici; MEDHISS (Mediterranean Health Interview Surveys) è un sistema di sorveglianza che ha utilizzato i dati disponibili sugli effetti sanitari a lungo termine in 4 Paesi del Mediterraneo (Italia, Francia, Slovenia e Spagna). In Italia, gli effetti sanitari a breve termine per esposizione a PM, NO₂ e O₃ sono stati studiati in 25 città tramite il progetto EPIAIR.

In seguito all'associazione del PM al tumore polmonare sancita dalla IARC, ENEA, in collaborazione con ISS e ISPRA, ha condotto uno studio di mortalità per tumore del polmone nella popolazione femminile di tutti i Comuni italiani capoluogo di provincia per i quali erano disponibili i dati di concentrazione di PM₁₀ e PM_{2,5} delle stazioni di monitoraggio nel periodo 2000-2011 (64 e 32 Comuni rispettivamente). Nella Figura 2 sono rappresentate le mappe relative alla mortalità per tumore polmonare e le concentrazioni di PM₁₀ dei Comuni in studio e nella Figura 3 gli andamenti della mortalità in funzione dei livelli sia di PM₁₀ che di

PM_{2,5}. È stato stimato un incremento unitario dei tassi di mortalità per tumore polmonare in funzione dell'incremento dei livelli di PM₁₀ pari a 0,325 corretto per abitudine al fumo e indice di deprivazione, con un numero complessivo di circa 300 decessi annui attribuibili ad esposizioni superiori a 20 µg/m³ (AQG OMS) in una popolazione di circa 8 milioni di donne residenti [4]. Per il PM_{2,5} non è stato possibile effettuare un'analisi statistica a causa del limitato numero di Comuni con misure disponibili. Utilizzando i modelli di diffusione degli inquinanti (ad esempio il Modello MINNI dell'ENEA) e definendo concentrazioni medie annue rappresentative per ciascun Comune, sarebbe possibile stimare l'impatto dell'inquinamento atmosferico sulla salute delle popolazioni residenti estendendo tale approccio a tutti i Comuni italiani. Stime realistiche di esposizione e del conseguente impatto sanitario sono infatti informazioni cruciali per i decisori politici e per valutare l'efficacia delle azioni intraprese per tutelare la salute dei residenti.

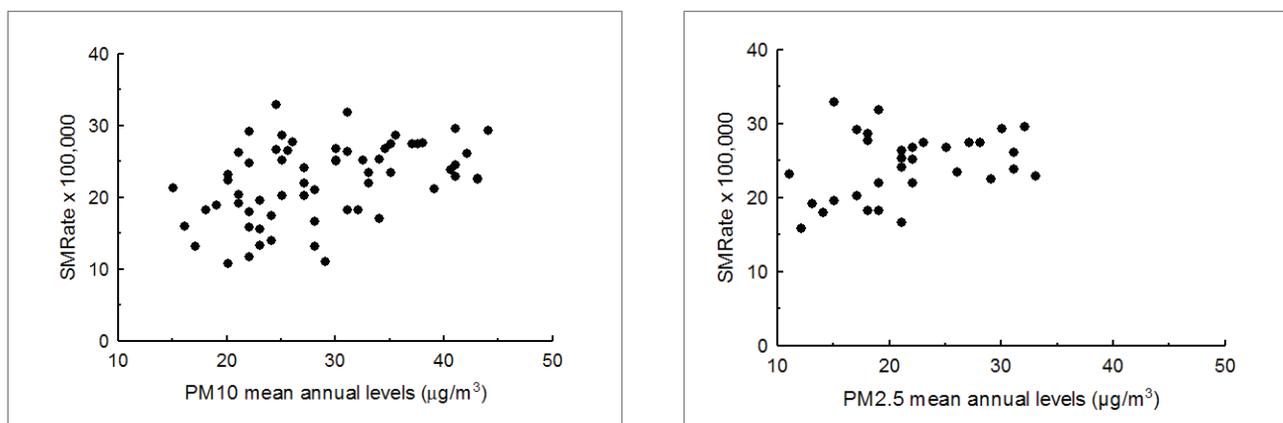


Fig. 3 Tassi di mortalità (SMRates) per tumore del polmone in funzione delle concentrazioni medie annue di PM₁₀ e PM_{2,5} rispettivamente per i 64 e 32 Comuni capoluogo di provincia

Fonte: ENEA - Uccelli et al., 2016

L'inquinamento atmosferico nei siti industriali contaminati

L'OMS definisce i siti contaminati come aree che ospitano attività umane che possono avere determinato contaminazione di suolo, acqua di falda e di superficie, aria e catena alimentare con modalità tali da risultare in impatti sulla salute.

La Sesta Conferenza dei Ministri dell'Ambiente e della Salute dei 53 Paesi della regione Europea dell'OMS svoltasi a Ostrava (Repubblica Ceca) nel giugno 2017, ha incluso il tema dei siti contaminati fra le priorità del Processo Europeo Ambiente e Salute. Nella Regione Europea dell'OMS vi sono circa 350.000 siti contaminati [5], retaggio di uno sviluppo industriale caratterizzato da elevati e non sempre adeguatamente riconosciuti impatti ambientali e sanitari.

Fra le azioni da intraprendere la dichiarazione di Ostrava menziona la compilazione di un inventario nazionale dei siti contaminati e delle loro emissioni, l'individuazione delle priorità per il risanamento ambientale (anche ribadendo il principio del "*chi inquina paga*"), l'accrescimento, a livello nazionale e regionale, della capacità di valutare l'impatto sulla salute dei siti contaminati.

In Italia i siti nei quali l'inquinamento è particolarmente diffuso, con conseguenti rischi per la salute, e che richiedono un impegno straordinario dello Stato per mettere in opera gli interventi di ripristino ambientale e tutela della salute, sono inclusi nella categoria dei Siti di Interesse Nazionale (SIN) per le bonifiche. La definizione dei SIN nella legislazione italiana (DLgs 152/06, art. 252), coerentemente con gli in-

dirizzi europei, si fonda sulla contaminazione dei suoli e dell'acqua di falda, ma anche l'inquinamento atmosferico, di origine industriale può risultare importante.

In Italia, la sorveglianza epidemiologica nei SIN è svolta nell'ambito del Progetto SENTIERI [6], che si basa sulla loro caratterizzazione ambientale, sulle patologie associate o associabili alle fonti di contaminazione secondo le indicazioni fornite dalla letteratura scientifica, la stima dei principali indicatori di salute a livello di popolazione (mortalità, ricoveri ospedalieri, incidenza dei tumori), l'interpretazione dei dati raccolti da parte di un gruppo di lavoro interdisciplinare e la formulazione di indicazioni di sanità pubblica.

Nella prima fase dello studio (1995-2002) si è osservato nell'insieme dei 44 SIN inclusi nel progetto una sovrarmortalità (differenza fra il numero di decessi osservati e attesi) di circa 10.000 casi di cui 1.500 dovuti a cancro del polmone. Nel periodo 1996-2005, con riferimento ai 18 SIN serviti da Registri Tumori, si è osservato un eccesso di incidenza dei tumori polmonari sia negli uomini (Rapporto Standardizzato di Incidenza-SIR-1.07; Intervallo di Confidenza al 90%-IC90%-1.05-1.09), che nelle donne (SIR 1.24; IC90% -1.21-1.28) basati rispettivamente su 9396 e 3046 casi osservati (Comba et al., 2014).

Importanti contributi a questo fenomeno sono stati forniti da siti contaminati caratterizzati da elevati livelli di inquinamento atmosferico di origine industriale, quali Taranto (uomini: SIR 155; IC90% 142-169, 377 osservati; donne: SIR 144; IC90% 116-176, 67 osservati), Porto Torres (uomini: SIR 116; IC90% 109-125, 595 osservati;

donne: SIR 159; IC90% 139-181, 163 osservati), Terni (uomini: SIR 114; IC90% 106-122, 628 osservati; donne: SIR 118; IC90% 103-134, 166 osservati).

La priorità è comunque quella di perseguire il risanamento ambientale documentando la riduzione dei livelli di esposizione, in attesa che ciò si rifletta (tenendo conto dei tempi di latenza della patologia in esame) su una corrispondente riduzione degli indicatori di incidenza e mortalità.

Discussione

Le diverse azioni messe in campo in questi ultimi 20 anni hanno indubbiamente prodotto un miglioramento della qualità dell'aria, ma le valutazioni condotte dall'OMS, dalla IARC e dall'EEA (Agenzia Europea dell'Ambiente) evidenziano il permanere di criticità soprattutto in alcuni contesti, quali le aree urbane e industriali e le aree caratterizzate da peculiari condizioni climatiche (pianura Padana). È necessario quindi ricercare e attuare azioni mirate e integrate, lavorando su più aspetti quali una pianificazione e gestione più moderna delle città, una riduzione dei carichi emissivi delle sorgenti ed un aggiornamento della legislazione di settore.

Anche uno dei target della Strategia Nazionale per lo Sviluppo Sostenibile, elaborata dal Ministero dell'Ambiente di concerto con gli altri Ministeri, riguarda espressamente la diminuzione dell'esposizione della popolazione ai fattori di rischio ambientale. L'esposizione della popolazione urbana al PM_{2,5} e PM₁₀ ed il superamento del limite giornaliero per il PM₁₀ rappresentano gli indicatori utili a monitorare l'efficacia delle azioni per il

raggiungimento di questo obiettivo. Nel settore delle emissioni industriali è necessario pianificare accurati controlli del territorio e richiedere una più ampia e diffusa applicazione delle BAT come previsto dalle direttive sulle emis-

sioni industriali (*Integrated Pollution Prevention Control -IPPC*). Infine, i modelli predittivi di dispersione degli inquinanti, attualmente molto affidabili, per la stima a breve e lungo termine delle concentrazioni degli inquinanti rappresentano

utili strumenti per la caratterizzazione dell'inquinamento, anche in termini di prevenzione dell'esposizione ad episodi emergenziali acuti spesso legati a peculiari condizioni meteorologiche in ampie aree del territorio italiano.

BIBLIOGRAFIA

1. International Agency for Research on Cancer (IARC). *Outdoor Air Pollution. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Volume 109*. Lyon, France: IARC, 2016. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol109/index.php>
2. EEA Report Air quality in Europe — 2016 report <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2016>
3. ISPRA 2016. Qualità dell'ambiente urbano – XII Rapporto. Edizione 2016.
4. Uccelli R., Mastrantonio M., Altavista P., Caiaffa E., Cattani G., Belli S., Comba P. *Female lung cancer mortality and long term exposure to particulate matter in Italy*. *European Journal of Public Health*, 27: 178-183, 2016. DOI:10.1093/eurpub/ckw203
5. M. van Liedekerke, G. Prokop, S. Rabl-Berge, M. Kibblewhite, G. Louwagie, *Progress in the Management of Contaminated Sites in Europe*, European Commission– Joint Research Centre – Institute for Environment and Sustainability, Report EUR 26376 2014
6. Pirastu R, Comba P, Conti S, Iavarone I, Fazzo L, Pasetto R, Zona A, Crocetti E, Ricci P. (Eds). SENTIERI – *Epidemiological Study of Residents in National Priority Contaminated Sites: mortality, cancer incidence and hospital discharges*. *Epidemiol Prev*. 2014;38(2); Suppl. 1:1-170. Italian

Metodi *in vitro* e *in silico* per la valutazione del potenziale tossicologico dei nanomateriali

Sulla base delle competenze acquisite in progetti nazionali ed europei, saranno descritte le criticità e le metodologie più idonee per la valutazione del potenziale tossicologico *in vitro* e *in silico* dei nanomateriali

DOI 10.12910/EAI2017-045

di **Flavia Barone, Isabella De Angelis, Cristina Andreoli e Chiara Laura Battistelli**, Istituto Superiore di Sanità; **Caterina Arcangeli e Giorgio Leter**, ENEA

I nanomateriali, secondo la definizione adottata dalla Commissione Europea (Commission Recommendation 2011/696/EU), sono materiali di origine naturale, o prodotti da attività antropiche o ingegnerizzati contenenti particelle singole o in forma di aggregati o agglomerati e in cui almeno il 50% delle particelle, nella distribuzione dimensionale numerica, ha una o più dimensioni esterne comprese fra 1 e 100 nanometri. Essi sono caratterizzati da proprietà peculiari, derivanti da un elevato rapporto tra area superficiale e volume. Questo comporta una maggiore percentuale di atomi di superficie rispetto agli ato-

mi interni, conferendo ai nanomateriali una elevata reattività e proprietà chimico-fisiche e strutturali completamente diverse rispetto alle forme convenzionali degli stessi materiali. Tali proprietà sono ampiamente sfruttate in diversi ambiti applicativi: da quello medico (sviluppo di materiali biocompatibili per diagnostica, *imaging*, terapia e ingegneria tissutale) a quello industriale (settori elettronico, automobilistico, chimico, tessile, alimentare, farmaceutico, cosmetico).

Se da una parte lo sviluppo esponenziale dei nanomateriali apre nuovi orizzonti nel settore produttivo industriale e in campo biomedico,

dall'altra può presentare problemi di rischio per la salute degli operatori, dei consumatori e dell'ambiente. Nei settori della nanotossicologia e nanocotossicologia emerge l'esigenza sia di progettare e produrre nanomateriali biocompatibili, sia la necessità di evitare i potenziali effetti tossici derivanti dal loro impiego. Entrambi gli aspetti richiedono lo sviluppo e la cooperazione di differenti esperienze e competenze scientifiche e regolatorie. A tal fine, gli ultimi anni hanno visto l'impegno di organismi nazionali e internazionali per individuare procedure adeguate, finalizzate a garantire uno sviluppo responsabile dei nanomateriali.

Anche la Commissione Europea promuove l'armonizzazione e la standardizzazione delle metodologie e dei saggi da utilizzare per lo studio dei nanomateriali e ha finanziato numerosi progetti di ricerca nell'ambito dei Programmi Quadro FP7 e Horizon 2020. L'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e l'ENEA hanno partecipato al progetto FP7 NANoREG - *A common European approach to the regulatory testing of nanomaterials* (2013-2017, www.nanoreg.eu) e l'ISS sta partecipando al progetto H2020 NanoReg2 - *Development and implementation of Grouping and Safe-by-Design approaches within regulatory frameworks* (2015-2018, www.nanoreg2.eu). Entrambi i progetti sono indirizzati a limitare le incertezze sulla sicurezza per la salute umana e l'ambiente dovute ad alcuni aspetti dei nanomateriali, sviluppando in un contesto regolatorio metodi

per la valutazione degli effetti e dei rischi ad essi legati. I risultati ottenuti forniranno la base per la stesura di un Libro Bianco di indirizzo politico, utilizzabile come strumento di riferimento per autorità regolatorie e industria.

Interazione dei nanomateriali con le soluzioni biologiche

La caratterizzazione chimico-fisica dei nanomateriali, condotta in ambiente secco, stabilisce le condizioni *ab initio* dei parametri necessari allo studio del loro possibile impatto sulla salute.

Quando particelle di dimensioni nanometriche sono disperse in una soluzione le loro caratteristiche chimico-fisiche subiscono delle modificazioni, dipendenti dall'interazione tra la superficie delle particelle con le molecole contenute

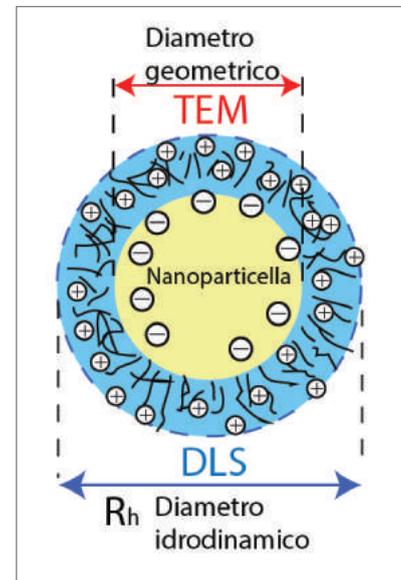
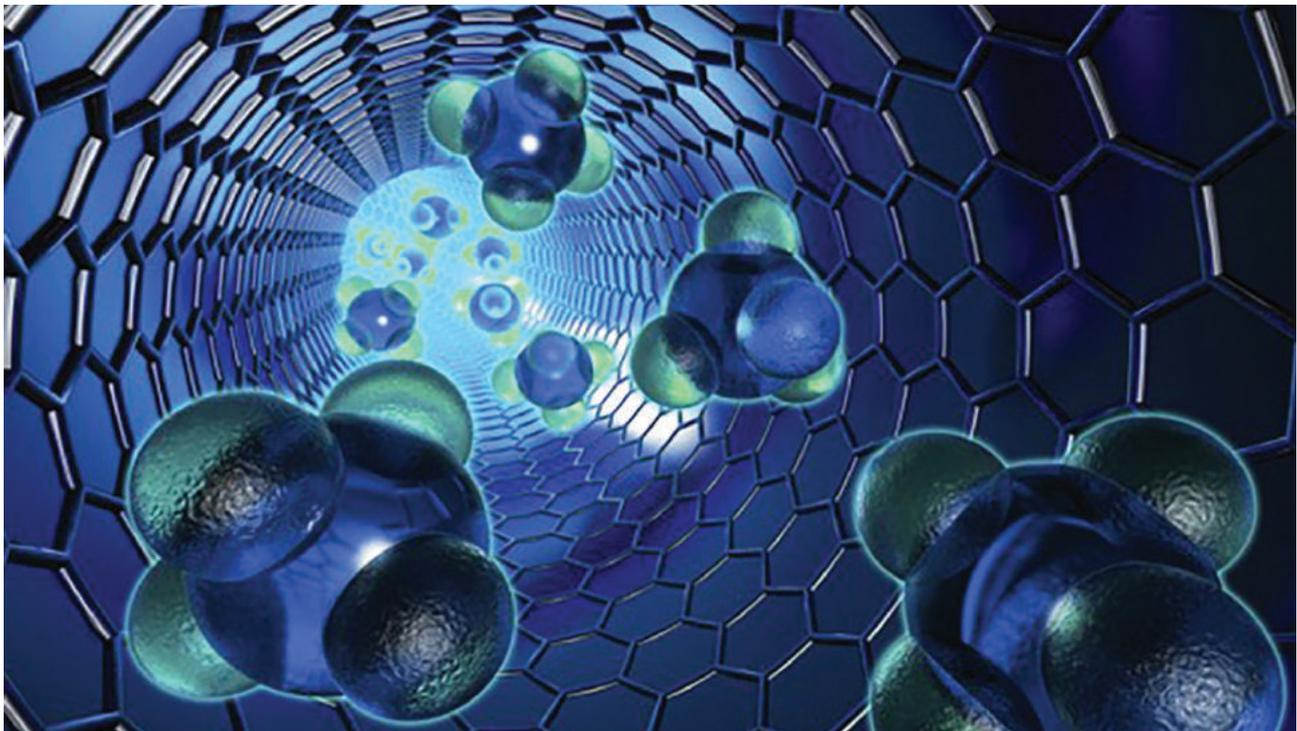


Fig. 1 Diametro idrodinamico; in rosso il diametro geometrico della nanoparticella pristina misurato con il microscopio elettronico a trasmissione (TEM) e il diametro idrodinamico R_h in blu, misurato in soluzione con il Dynamic Light Scattering (DLS)



nel mezzo, che possono influenzare la tossicità dei nanomateriali. In soluzione, le nanoparticelle (NP) tendono a formare degli aggregati di forme e dimensioni diverse modificando di fatto le loro dimensioni medie, la loro concentrazione e l'area superficiale totale, parametri cruciali per gli studi *in vivo* e *in vitro*. Una nanoparticella posta in soluzione forma un sistema colloidale per un tempo più o meno lungo. Una maggiore stabilità dei sistemi colloidali, previene il fenomeno di aggregazione delle particelle in quanto si originano repulsioni elettrostatiche che ne favoriscono la dispersione. Il parametro utilizzato per calcolare la stabilità colloidale è il potenziale Z che si riferisce al potenziale generato da un doppio strato di cariche elettriche. Quando il potenziale è basso, le forze attrattive prevalgono sulle repulsive e quindi si formeranno maggiori aggregati.

La conoscenza della reale concentrazione delle particelle alla quale il sistema biologico è esposto è importante per determinare la stima del rischio per la salute e può essere espressa sia come numerosità particellare sia come area superficiale totale e risente fortemente dal grado di aggregazione delle particelle. Negli esperimenti *in vitro* la variazione di tali parametri può influire sul maggiore o minore grado di endocitosi (internalizzazione delle particelle da parte delle cellule) dato importante per definire il modo di azione del nanomateriale. Anche la particella che non si aggrega subisce modifiche chimico-fisiche, in particolare la dimensione e la reattività chimica. La particella nella forma pristina (in ambiente secco) presenta un diametro geometrico che può essere misurato con la microscopia elettronica. In soluzione, invece, il

diametro è misurato come “diametro idrodinamico” (Figura 1) che tiene conto del diametro geometrico della nanoparticella e dello spessore delle molecole del mezzo che interagiscono con essa. Anche la carica elettrica superficiale può cambiare a causa dell'adsorbimento di molecole cariche opposte; dati sperimentali mostrano che gli effetti citotossici e genotossici sono potenziati se le nanoparticelle hanno una carica positiva [1].

Approcci *in vitro* per la valutazione della tossicità dei nanomateriali

I saggi *in vitro* sono particolarmente rilevanti nelle fasi iniziali della definizione della pericolosità di un nanomateriale. Inoltre, i dati *in vitro* possono contribuire alla interpretazione dei risultati *in vivo* per identificare i meccanismi di azione e per la categorizzazione dei nanomateriali.

I parametri più frequentemente studiati *in vitro* sono: citotossicità, apoptosi, stress ossidativo, genotossicità, processi infiammatori. Non esistono, ad oggi, saggi *in vitro* standardizzati o protocolli sperimentali specifici per la valutazione tossicologica dei nanomateriali e per l'estrapolazione dei risultati nella valutazione del rischio. Molte risorse sono al momento concentrate sulla ottimizzazione e validazione di metodi *in vitro* rilevanti per i nanomateriali, soprattutto a fini regolatori.

I requisiti essenziali per produrre dati robusti e significativi *in vitro* sono:

- accurata caratterizzazione del nanomateriale, inclusa la definizione delle proprietà chimico-fisiche, prima, durante e dopo il saggio;
- uso di sistemi di dosimetria reali-

stici e correlati ai possibili scenari di esposizione;

- utilizzo di più linee cellulari (possibilmente umane) rappresentative di possibili organi bersaglio e di un congruo intervallo di dosi (almeno 5 diverse concentrazioni);
- presenza di controlli interni (positivi e negativi) e possibilmente di nanomateriali di riferimento per la comparazione intra e interlaboratorio.

L'esperienza maturata in ISS nei saggi di citotossicità, nell'ambito di progetti nazionali e internazionali e con diversi nanomateriali, ha confermato che molti dei saggi colorimetrici convenzionalmente utilizzati per la valutazione della citotossicità (rilascio di Rosso Neutro, esclusione del Trypan Blue, misura dell'attività metabolica) devono essere applicati con cautela ai nanomateriali in quanto questi ultimi possono interferire con i componenti del saggio o con i sistemi di rilevamento ottico [2]. Nel progetto FP7 NANoREG è stato utilizzato da numerosi partecipanti un protocollo per il saggio dell'MTS che ha dato buoni risultati in termini di ripetibilità dei dati, utilizzando diversi nanomateriali e diverse linee cellulari.

Molto promettente è anche considerato il saggio della *Colony Forming Efficiency*, un saggio clonogenico basato sulla capacità delle cellule integre di formare colonie. Il saggio è *label-free* e può essere effettuato con qualsiasi cellula aderente in grado di formare colonie.

I saggi *in vitro* di genotossicità sono uno strumento importante per la comprensione dei meccanismi di tossicità e la valutazione dei rischi per la salute dei nanomateriali. Al momento nessun test risulta validato per i nanomateriali e al riguardo



l'OCSE ha proposto delle modifiche per alcuni di essi, per adeguarli alle peculiari caratteristiche dei nanomateriali. I possibili adattamenti sperimentali di questi saggi di genotossicità sono stati applicati nell'ambito di progetti nazionali ed internazionali in cui l'Istituto Superiore di Sanità e l'ENEA sono stati coinvolti per studiare l'attività citotossica e genotossica di nanomateriali di largo utilizzo. In particolare, sono stati applicati il test del micronucleo, per il quale esiste una linea guida standardizzata OCSE (TG487: *In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*), e il saggio della Cometa. Il primo è considerato il test d'elezione per la valutazione della genotossicità dei nanomateriali per la sua capacità di identificare sia la clastogenicità indotta dalle specie reattive dell'ossigeno, uno dei principali meccanismi della genotossicità dei nanomateriali, sia i potenziali effetti aneugenici dovuti all'interazione fisica dei nanomateriali con il fuso e l'apparato mitotico. Il secondo è molto utilizzato per valutare la capacità dei nanomateriali di interagire con il DNA in quanto è un test molto sensibile nel rilevare danni al DNA in forma di rotture a singolo e doppio filamento, sia dirette sia mediate da processi di riparazione del DNA (siti abasici). Questo saggio è in grado di mettere in evidenza i danni al DNA derivanti dai processi di stress ossidativo tramite l'utilizzo di enzimi del processo di riparazione del danno ossidativo che, riconoscendo e rimuovendo purine e pirimidine ossidate, aumentano la specificità del danno rilevato. Entrambi i test si sono dimostrati utili per la valutazione della genotossicità dei nanomateriali e la comprensione dei possibili meccanismi di azione [3]. Il miglioramento dei protocolli sperimentali *in vitro*, che includono

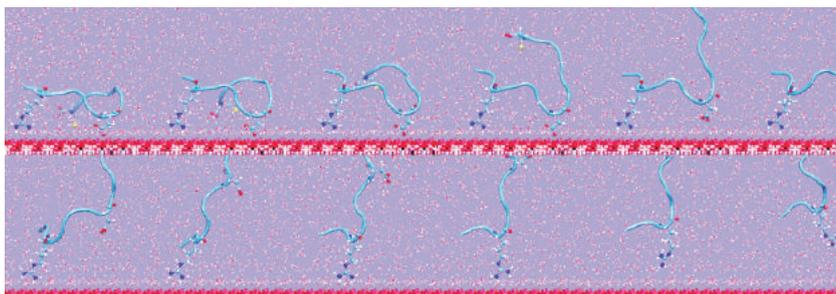


Fig. 2 Esempio di simulazione di dinamica molecolare per la comprensione dei meccanismi che avvengono all'interfaccia tra una molecola biologica (peptide) e un nanomateriale inorganico (superficie di ossido di titanio, TiO_2). La forza d'interazione tra il peptide e il nanomateriale può essere determinata "strappando" il peptide dal nanomateriale (dinamica molecolare guidata) e calcolando la forza richiesta per staccare il peptide. Nella figura è illustrato il percorso di dissociazione del peptide dal nanomateriale, dovuto alla rottura delle interazioni elettrostatiche a carico degli aminoacidi responsabili dell'ancoraggio al nanomateriale [adattato da Arcangeli et al. 2013 *Nanosci Nanotechnol Lett*, 5:1147]

oltre che le modalità di trattamento anche le condizioni di sospensione e caratterizzazione dei nanomateriali, sono state valutate nel progetto FP7 NANoREG che ha coinvolto numerosi laboratori europei, che hanno condiviso gli stessi protocolli e gli stessi nanomateriali, e che ha fornito risultati interessanti per la ripetibilità dei risultati.

Modelli predittivi in silico per la nanotossicologia e applicazioni in ambito regolatorio

Per fare fronte alla recente richiesta e necessità di predire la tossicità dei nanomateriali, negli ultimi anni sono stati utilizzati diversi metodi *in silico* [4]. Tali approcci includono metodi QSAR (quantitative structure-activity relationship), metodi del raggruppamento (*grouping*), delle categorie e del *read-across*.

I metodi QSAR sono basati su modelli statistici che mettono in relazione un set di descrittori di un composto chimico alla sua attività biologica. Tuttavia poiché esistono differenze sostanziali tra i nanomateriali e le sostanze chimiche che tradizionalmente sono oggetto di

questi modelli, i descrittori utilizzati sono spesso inadeguati e non tengono conto delle interazioni che avvengono all'interfaccia bio-inorganica. Infatti, indipendentemente dalla via di esposizione ai nanomateriali (inalatoria, orale, cutanea, intraperitoneale), il primo "organo" d'interazione è il fluido biologico (sangue, citoplasma) dove i nanomateriali adsorbono, in maniera selettiva, le proteine per formare un complesso chiamato protein-corona. Questo processo sembra essere governato da interazioni molecolari tra i gruppi chimici di superficie dei nanomateriali e quelli dei residui amminoacidici delle proteine. Grazie al rapido avanzamento nel campo della tecnologia HPC (High Performance Computing) e a seguito degli avanzamenti in quello della modellistica molecolare sono in corso studi volti alla creazione di modelli d'interfacce ibride per ottenere un nuovo set di descrittori. In particolare nel campo della modellistica molecolare, simulazioni di dinamica molecolare di interfacce bio-inorganiche sono state recentemente utilizzate sia per lo studio dei possibili effetti dei nanomateriali sulla struttura molecolare e

sulla funzionalità delle biomolecole (proteine, DNA e membrane) che per ricavare informazioni sulla stabilità del legame instaurato tra il nanomateriale e la componente biologica, considerando che le forze di interazione calcolate possono essere utilizzate come descrittori ([5] e Figura 2). Nonostante queste potenzialità, le simulazioni di sistemi ibridi per studi nanotossicologici sono ancora in una fase iniziale.

Il metodo *in silico* più utilizzato in ambito regolatorio è l'approccio del raggruppamento e del *read-across*. Questo metodo si avvale di informazioni relative a sostanze analoghe per predire le proprietà di sostanze di cui non sono presenti dati.

Negli ultimi anni si sono avviate, in ambito internazionale, numerose iniziative volte a favorire l'applicazione delle metodologie di raggruppamento e *read-across* ai nanomateriali per fini regolatori: progetti di ricerca EU

FP7 MARINA e Horizon2020 Nano-Reg2, documenti prodotti da Agenzie europee (ad es. https://echa.europa.eu/documents/10162/23036412/appendix_r6_nanomaterials_en.pdf/71ad76f0-ab4c-fb04-acba-074cf045eaaa). Esistono differenti modi di raggruppare i nanomateriali, a seconda delle informazioni disponibili e delle proprietà che devono essere predette. Nei diversi approcci proposti, gli elementi cruciali sono sempre i parametri chimico-fisici: le proprietà intrinseche per l'identificazione dei nanomateriali (come composizione, dimensione, forma); le proprietà dei nanomateriali che, in base al mezzo di dispersione, ne determinano il comportamento (come solubilità, idrofobicità); le proprietà per la valutazione del pericolo fisico, per l'uomo e per l'ambiente [6]. I dati relativi ai parametri chimico-fisici vengono utilizzati per definire la

tossicocinetica, l'(eco)tossicità ed il destino ambientale dei nanomateriali e quindi per elaborare una giustificazione per il raggruppamento che sia robusta e scientificamente valida.

La nanotecnologia è in rapida espansione e proprio per il numero elevato di nanoforme presenti, nell'ambito della valutazione del pericolo sarà fondamentale utilizzare approcci alternativi che permettano predizioni di proprietà per singoli nanomateriali oppure per gruppi di nanomateriali. L'applicabilità di tali metodologie richiede l'utilizzo di dati sperimentali di buona qualità e standardizzati che per i nanomateriali sono difficili da ottenere, proprio per le loro peculiarità: per questa ragione ad oggi l'applicabilità di tali metodologie risulta ancora nella fase iniziale.

*Per saperne di più:
flavia.barone@iss.it*

BIBLIOGRAFIA

1. E. Fröhlich (2012), "The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles", *Int J Nanomedicine*, 7: 5577-5591
2. F. Barone, I. De Angelis, B. De Berardis, A. Zijno, C. Andreoli, P. Degan, M.L. Polci, M. Alessandrelli, P. Di Prospero Fanghella (2015), "Implementazione di metodi validati e sviluppo di metodi *in vitro* per determinare le caratteristiche fisico-chimiche e la potenziale attività geno/tossicologica di micro e nanoparticelle di biossido di titanio", *Rapporti ISTISAN 15/34*, Istituto Superiore di Sanità, Roma
3. A. Zijno, I. De Angelis, B. De Berardis, C. Andreoli, M.T. Russo, D. Pietraforte, G. Scorza, P. Degan, J. Ponti, F. Rossi, Barone F (2015), "Different mechanisms are involved in oxidative DNA damage and genotoxicity induction by ZnO and TiO₂ nanoparticles in human colon carcinoma cells", *Toxicol In Vitro*, 29(7):1503-1512
4. Y. Mu, F. Wu, Q. Zhao, R. Ji, Y. Qie, Y. Hu, C. Pang, D. Hristozov, J. P. Giesy, B. Xing (2016), "Predicting toxic potencies of metal oxide nanoparticles by means of nano-QSARs", *Nanotoxicology*, 10(9): 1207-1214
5. C. Arcangeli, I. Borriello, G. Gianese, M. Celino, P. Morales (2013), "Organic functionalization of metal oxide surfaces: An atomic scale modeling approach", *Nanosci Nanotechnol Lett*, 5(11):1147-1154
6. A.G. Oomen, E.A. Bleeker, P.M. Bos, F. van Broekhuizen, S. Gottardo, M. Groenewold, D. Hristozov, K. Hund-Rinke, M.A. Irfan, A. Marcomini, W.J. Peijnenburg, K. Rasmussen, A.S. Jimenez, J.J. Scott-Fordsmand, M. van Tongeren, K. Wiench, W. Wohlleben, R. Landsiedel (2015) "Grouping and Read-Across Approaches for Risk Assessment of Nanomaterials", *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12(10): 13415-13434

Tecnologie e ricadute cliniche di TOP IMPLART, prototipo di impianto per protonterapia

Un acceleratore di protoni compatto completamente lineare ad alta frequenza, per offrire una possibile soluzione ottimale, con alte prestazioni e con costi limitati, ai problemi riscontrati dei sistemi basati su acceleratori circolari

DOI 10.12910/EAI2017-046

di **Luigi Picardi, Concetta Ronsivalle e Carmela Marino, ENEA; Evaristo Cisbani, Maria Antonella Tabocchini, Istituto Superiore di Sanità; Lidia Strigari, Istituti Fisioterapici Ospitalieri-Istituto nazionale tumori Regina Elena (IRE-IFO)**

Le radiazioni ionizzanti sono impiegate nel trattamento dei tumori per la loro capacità di danneggiare il DNA delle cellule; qualitativamente il danno è tanto più probabile ed elevato tanto più l'energia radiativa viene depositata nelle cellule. I fotoni gamma risultano i più utilizzati per la loro relativa semplicità di produzione; essi vengono, infatti, generati da fasci di elettroni accelerati per poi essere indirizzati verso il bersaglio tumorale da più direzioni, con il risultato di ridurre l'energia depositata, e quindi il danno, sui tessuti sani circostanti. Viceversa, i fasci di parti-

celle pesanti (adroni) penetrano nei tessuti con una modesta diffusione e una profondità determinata dalla loro energia iniziale, depositando l'energia massima appena prima di fermarsi. Questo consente un irraggiamento più conformato alla specifica regione di interesse e un danno ai tessuti sani di gran lunga inferiore a quello prodotto dai fotoni.

Grazie agli sviluppi nella tecnologia degli acceleratori e ai progressi nella realizzazione dei piani di trattamento, l'uso di adroni nella radioterapia oncologica si sta ampliando, come dimostra il numero crescente dei centri esistenti di adroterapia: 71 *fa-*

cilities sono in operazione nel mondo, dieci delle quali impiegano oltre ai protoni anche ioni carbonio. Tipicamente esse impiegano ciclotroni per accelerare i protoni e sincrotroni per accelerare protoni e ioni carbonio. Le dimensioni delle strutture necessarie e la loro complessità sono indubbiamente superiori, rispetto a un impianto di fotoni gamma, con conseguenti maggiori costi di realizzazione e utilizzo che ne frenano la diffusione, nonostante l'indubbio vantaggio terapeutico.

Lo sviluppo di nuovi acceleratori più compatti, efficienti, in grado di ridurre la durata del trattamento (ipo-



frazionamento) e sempre più precisi nel rilascio di energia, permetterebbe una riduzione dei costi di impianto, di operazione e manutenzione, oltre ad una maggiore efficacia terapeutica.

L'ENEA, sulla base della sua esperienza nella progettazione e realizzazione di acceleratori compatti medicali per elettroni, ha studiato uno schema alternativo basato su un ac-

celeratore di protoni compatto completamente lineare ad alta frequenza, per offrire una possibile soluzione ottimale ai succitati problemi dei sistemi basati su acceleratori circolari. Sulla base di un finanziamento da parte della Regione Lazio di 11 milioni di euro, questo acceleratore è in fase di realizzazione e test presso il Centro ENEA di Frascati nell'ambito del Progetto TOP (Terapia Oncolo-

gica con Protoni)-IMPLART (*Intensity Modulated Proton Linear Accelerator for Radiotherapy*) [1], lanciato dall'ENEA e in collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) e IFO-Istituto nazionale tumori Regina Elena (IFO-IRE) di Roma.

L'ENEA ha avuto il compito di realizzare l'impianto e i modelli sperimentali adeguati a migliorare la sperimentazione preclinica, l'ISS di

Struttura SCDTL

La struttura SCDTL è composta da una serie di piccoli acceleratori di tipo DTL denominati *tank*, composti da poche celle di lunghezza $\beta\lambda$ ($\beta=v/c$, v =velocità della particella, c =velocità della luce, λ =lunghezza d'onda). Il foro di passaggio delle particelle ha un diametro di 4-5 mm. Le *tank* sono accoppiate

da cavità poste fuori asse e nello spazio tra le tank sono posizionati piccoli quadrupoli a magneti permanenti di lunghezza 33 mm che provvedono alla focalizzazione trasversa del fascio. Questo tipo di struttura presenta un'elevata efficienza nella regione tra 5 e 70 MeV e, in virtù di tale caratteristica, risulta cruciale per l'operazione di un acceleratore per protoni completamente lineare e operante ad alta frequenza (3 GHz).

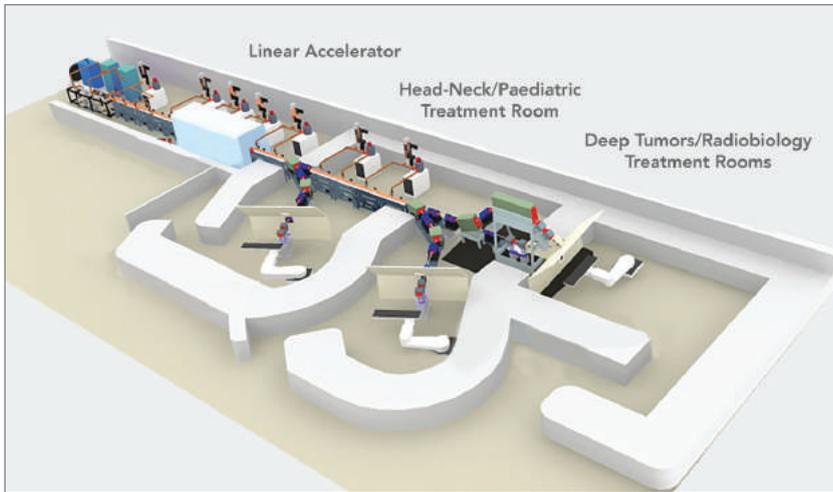


Fig. 1 Schema dell'acceleratore TOP-IMPLART nella versione completa
Fonte: elaborazione degli autori

realizzare monitor di fascio e sistemi dosimetrici e di controllo e di effettuare la caratterizzazione radiobiologica del fascio, l'IFO di studiare i piani di trattamento e di attuare la messa a punto dei protocolli clinici. L'impianto, una volta conclusa la sperimentazione, verrà trasferito all'ospedale IFO-Regina Elena di Roma, destinato a diventare il primo Centro di protonterapia del centro-sud Italia.

L'acceleratore TOP-IMPLART: schema generale e attuali condizioni operative

L'acceleratore TOP-IMPLART (Figura 1) consiste in una sequenza di acceleratori lineari a radiofrequenza: un iniettore operante a 425 MHz seguito da una serie di moduli operanti ad una frequenza di 2997,92 MHz. L'iniettore è una macchina commerciale (modello PL-7 prodotto da ACCSYS-HITACHI) composta da una sorgente di tipo duoplasmatron a 30 keV, un RFQ (*RadioFrequency Quadrupole*) fino a 3 MeV e un DTL (*Drift Tube Linac*) fino a 7 MeV. La parte ad alta frequenza è compo-

sta da due tipi di acceleratori lineari: SCDTL (*Side Coupled DTL*) da 7 a 71 MeV, un tipo di struttura innovativo brevettato da ENEA nei primi anni 90 (vedi riquadro) e CCL (*Coupled Cavity Linac*), una struttura simile a quelle usate negli acceleratori medici di elettroni fino a 150 MeV per

quanto riguarda il segmento coperto dall'attuale finanziamento e, in una seconda fase, fino a 230 MeV.

Il cambio della tipologia di struttura è legato alla dipendenza dell'efficienza dall'energia e dunque dalla ottimizzazione dell'impiego della potenza installata.

Il segmento di macchina [2], realizzato sulla base di una prima *tranche* di finanziamento di 4,5 milioni di euro e attualmente operativo, è composto dall'iniettore, una linea di trasporto (LEBT) che include quattro quadrupoli elettromagnetici e dalle prime quattro strutture di tipo SCDTL alimentate da un klystron da 10 MW di picco in un impulso della durata di circa 4 microsecondi (Figura 2). Due energie sono disponibili in uscita: 35 MeV (quarta struttura accesa) oppure 27 MeV (quarta struttura spenta). Dopo i primi due quadrupoli è inserito un magnete a 90 gradi, che quando acceso, devia i protoni su una linea verticale dedicata ad esperimenti di radiobiologia

Campioni biologici
Irraggiamenti per esperimenti di radiobiologia cellulare ed animale
Esposizione a protoni di materiale biologico per simulazioni di radiazioni cosmiche
Irraggiamento di vegetali
Campioni non biologici e altri irraggiamenti
Spettroscopia X indotta da protoni - analisi PIXE e PIXE-differenziale di beni culturali
Calibrazione di sistemi di monitor di dose per radioterapia
Test di dosimetri innovativi
Misure radiazione secondaria indotta da protoni – misure passive ed attive di campi neutronici
Sviluppo di dosimetri basati su LiF

Tab. 1 Attività sperimentale effettuata con il fascio di protoni presso il Centro ENEA di Frascati



cellulare con protoni di energia compresa tra 3 e 7 MeV.

Il vantaggio della macchina modulare è il fascio sempre attivo, anche ad energie inferiori di quelle cliniche. Negli intervalli tra le fasi di montaggio dei vari moduli acceleranti, che determinano l'innalzamento di energia, vengono effettuati esperimenti di radiobiologia e irraggiamenti di campioni per altri programmi e per mettere a punto le diagnostiche, la dosimetria, e i sistemi di "delivery" [3]. Nella Tabella 1 è sintetizzata l'attività sperimentale effettuata con il fascio di protoni già attivo a Frascati. Nella referenza [4] sono riportati i risultati di uno studio dosimetrico sull'omogeneità e la riproducibilità del fascio a 27 MeV che è stato condotto utilizzando diversi rivelatori: una camera a ionizzazione 2D sviluppata da ISS, film EBT3, un diodo a base di silicio, MOSFET, cristalli LiF e dosimetri alanina. Le misure effettuate a 1 metro di distanza dall'acceleratore dove la dimensione del fascio è sufficientemente grande per irraggiare la maggior parte dei bersagli impiegati nei vari esperimenti indicano una omogeneità del 4% su una superficie circolare di 16 mm di diametro e una riproducibilità migliore del 5%.



Fig. 2 Segmento dell'acceleratore TOP-IMPLART attualmente in operazione presso il Centro ENEA di Frascati

Fonte: foto degli autori

Il segmento di macchina successivo è in corso di realizzazione (sempre nella sua versione sperimentale a Frascati) sulla base di una seconda *tranche* di finanziamento di 6,5 milioni di euro. Entro il 2018 si prevede di produrre un fascio di energia maggiore di 62 MeV (energia sufficiente ad effettuare la terapia per la cura del melanoma oculare), e di arrivare nel giro di ulteriori due anni ad un fascio di 150 MeV, che è l'energia necessaria per il trattamento di tumori pediatrici e del distretto testa-collo.

Vantaggi e ricadute cliniche

La scelta non convenzionale di un acceleratore lineare operante ad alta frequenza presenta numerosi vantaggi rispetto agli acceleratori attualmente in uso (ciclotroni e sincrotroni) nei centri di protonterapia:

- è un impianto lungo ma leggero e stretto perché usa una tecnologia ad alta frequenza (3 GHz) e si snoda nella zona che negli altri impianti è destinata alle linee di trasporto fascio;

Variazione di energia in ciclotroni, sincrotroni e acceleratori lineari

I ciclotroni, compatti ma molto pesanti, lavorano ad energia fissa e per poter diminuire l'energia delle particelle, in modo da variare la profondità di penetrazione nel bersaglio, vengono utilizzati degli assorbitori che producono grosse perdite di fascio con conseguenti problemi di attivazione e la produzione di radiazione secondaria.

I sincrotroni, macchine più complesse che si estendono su un'area ancora maggiore, al contrario variano l'energia in maniera attiva, ma in tempi lunghi (di circa un secondo).

L'acceleratore lineare, dagli specialisti chiamato semplicemente linac, acronimo di lin(ear) ac(elerator), può farlo anch'esso in maniera attiva, ma a frequenze dell'ordine di 100-200 Hz, cambiando in maniera elettronica l'energia tramite lo spegnimento dei vari moduli e la variazione di ampiezza e fase nell'ultimo modulo acceso.

- è un sistema modulare che consente di avere più output ad energie differenti e operare in tempi brevi con aggiornamenti successivi, oppure una semplice *single room facility*;
- è un sistema tecnologicamente simile a quelli della radioterapia convenzionale con elettroni (linac a 3 GHz), consente una facile manutenzione, e consuma una potenza elettrica minore delle altre macchine;
- è un sistema versatile nelle *performance* (possibilità di rapida variazione di intensità ed energia per un trattamento rapido e con-

formazionale, in grado di seguire al meglio i movimenti involontari degli organi);

- è un sistema molto pulito dal punto di vista radio-protezionistico: le particelle si perdono a bassa energia (<18 MeV) e non c'è quasi attivazione, per cui è richiesta una schermatura ridotta rispetto a quella necessaria alle altre macchine.

Conclusioni

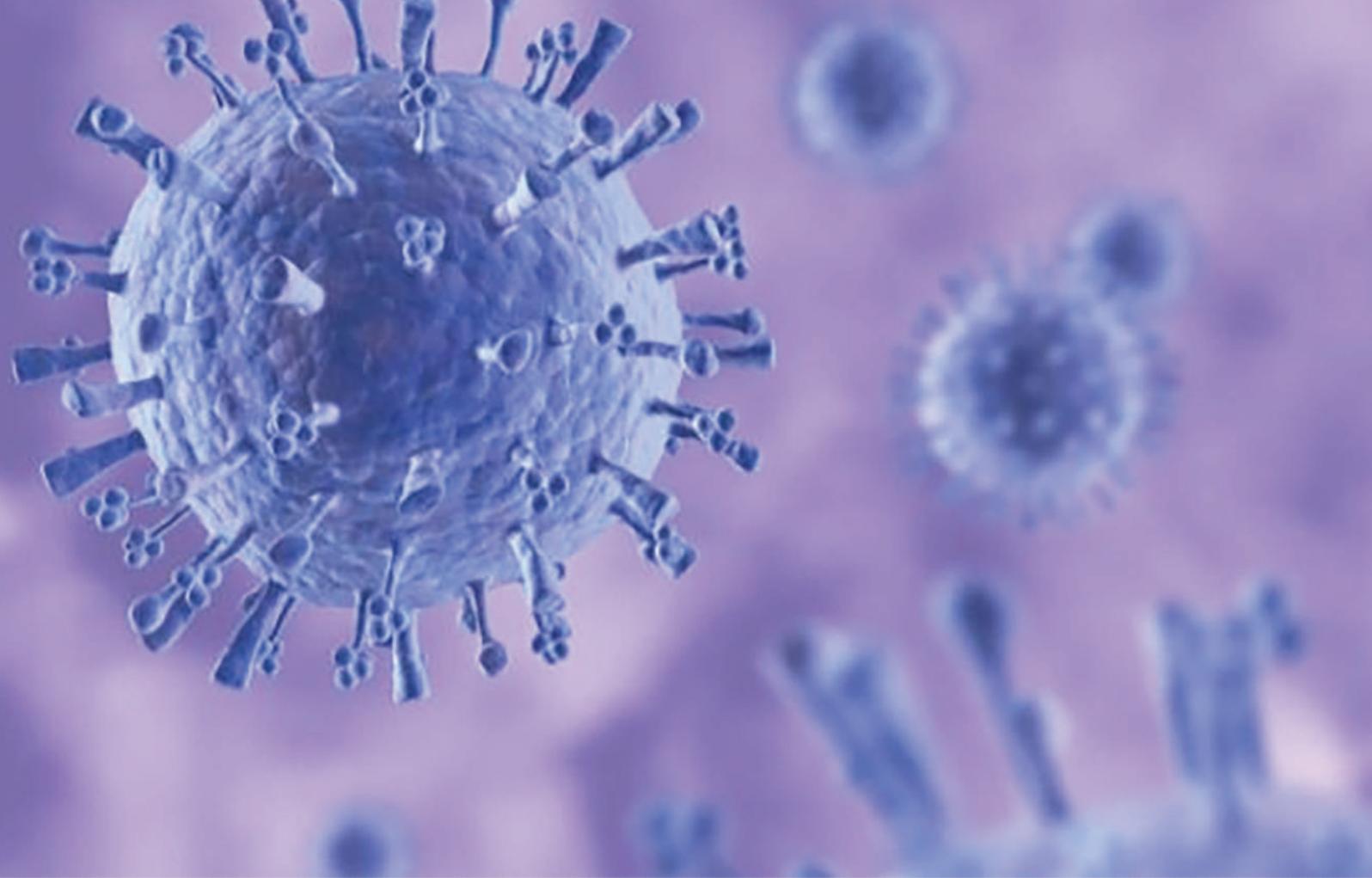
Attualmente la massima energia del fascio di protoni prodotto dall'acceleratore TOP-IMPLART è

35 MeV, ma l'impianto sperimentale è in fase di sviluppo fino ad ottenere un fascio di 150 MeV, energia adatta al trattamento di tumori di media profondità. Si prevede, nel futuro, attraverso l'acquisizione di ulteriori finanziamenti, un'ulteriore *upgrade* fino a 200-230 MeV, al fine di realizzare una macchina adatta al trattamento di tutti i tumori eleggibili per questo tipo di trattamento, in particolare i tumori profondi dell'adulto e i tumori pediatrici.

*Per saperne di più:
luigi.picardi@enea.it*

BIBLIOGRAFIA

1. C. Ronsivalle et al., The Top-Implart Project, *Eur. Phys. J. Plus*, 126: 68 (2011) 1-15
2. C. Ronsivalle et al., The Top-Implart Linac: Machine Status and Experimental Activity, *Proceedings IPAC17* (pre-release available on conference website)
3. M. Vadrucchi et al., Irradiation activity with the Top-Implart proton linear accelerator, accettato da *J. of Radiation and Application*, maggio 2017
4. C. De Angelis et al., Characterization of A 27 Mev Proton Beam Linear Accelerator, sottomesso a *Radiation Protection Dosimetry*, giugno 2017



Strategie per lo studio della genetica della suscettibilità alle radiazioni ionizzanti

L'impiego di modelli animali portatori di geni che modulano la suscettibilità genetica alle radiazioni ionizzanti può facilitare la mappatura dei loci della risposta individuale alle radiazioni, con importanti ricadute sulla salute umana

DOI 10.12910/EAI2017-047

di Simonetta Pazzaglia, Mirella Tanori, Emanuela Pasquali, Arianna Casciati, Mariateresa Mancuso, Anna Saran, ENEA

Fonti di radiazione naturali e artificiali contribuiscono all'esposizione umana costituendo un pericolo per la salute. Oltre alle radiazioni solari e ai raggi cosmici, la radioattività è presente nel suolo, negli edifici, nel cibo che mangiamo e nell'acqua che beviamo.

Alla complessità di questo scenario si aggiunge l'aumento dell'uso delle radiazioni ionizzanti in medicina, sia in campo diagnostico che terapeutico. In particolare, circa il 50% dei pazienti oncologici è trattato con la radioterapia (circa 120.000 ogni anno in Italia). Nonostante molte evidenze suggeriscano l'esistenza di tangibili differenze nella radiosensibilità individuale, attualmente la radioterapia è prescritta senza considerare tali differenze nella risposta dei pazienti. Malgrado siano stati ottenuti importanti progressi verso piani di trattamento personalizzato, riguardanti soprattutto le modalità di erogazione della dose prescritta, gli sforzi per la comprensione dei parametri biologici che definiscono la radiosensibilità individuale non hanno purtroppo ottenuto un successo analogo. Lo sviluppo di saggi biologici per prevedere la risposta del paziente alla radioterapia rappresenta pertanto uno degli obiettivi principali della radioterapia oncologica. Tale tecnologia potrebbe, ad esempio, tradursi in un'ottimizzazione dei protocolli radioterapici, una migliore valutazione della risposta individuale e della prognosi, e facilitare la personalizzazione dei parametri di dose. Dati sperimentali ottenuti da studi sull'uomo e sull'animale suggeriscono che il danno tissutale da radiazioni è in parte geneticamente regolato. L'entità delle reazioni di tossicità alle radiazioni è probabilmente determinata da un

controllo poligenico, non dovuta quindi ad alterazioni di singoli geni, ma risultante dall'interazione di numerosi alleli di resistenza e suscettibilità con penetranza variabile (Figura 1a) e alla loro interazione con fattori ambientali. L'identificazione delle variabili coinvolte nel controllo genetico delle malattie multifattoriali è pertanto estremamente complessa e nonostante i progressi nell'individuazione di geni di suscettibilità per molte malattie complesse, quali distrofia muscolare di Duchenne, fibrosi cistica e malattia di Huntington, i determinanti genetici della suscettibilità dei tessuti alle radiazioni rimangono poco compresi e definiti. L'identificazione di questi geni potrebbe permettere un pre-screening individuale del profilo di rischio prima di un'esposizione medica o professionale, o immediatamente dopo un'esposizione accidentale. Questa conoscenza potrebbe anche essere sfruttata per lo sviluppo di test pre-

dittivi della risposta clinica individuale alle radiazioni. L'impatto di un'analisi accurata sarebbe determinante e avrebbe il duplice obiettivo di individualizzare il trattamento in base al profilo genetico e migliorare la qualità della vita dei pazienti che sopravvivono a lungo termine alle cure oncologiche.

L'analisi genetica in modelli animali

L'uso di modelli animali per lo studio di tratti genetici complessi offre indubbi vantaggi, tra cui una ridotta eterogeneità genetica, una maggiore precisione nel quantificare il fenotipo e la possibilità di regolare i fattori ambientali (Figura 1b). Questi vantaggi, combinati con l'abilità di manipolare il genoma di topo tramite strategie di accoppiamento selettivo e approcci d'inattivazione genetica specifica, offrono allo studio dei tratti complessi un elevato po-

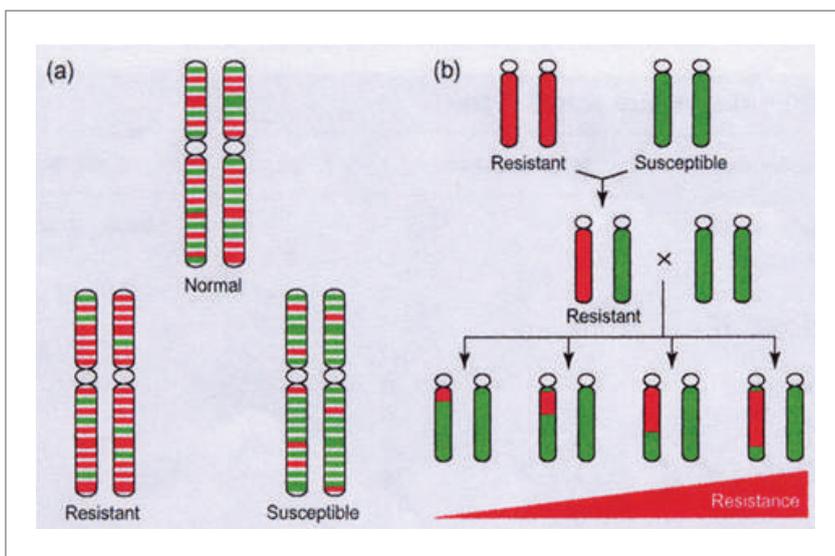


Fig. 1 (a) Schema del controllo poligenico di caratteri complessi nell'uomo. (b) Le differenze fenotipiche tra ceppi murini puri consentono strategie di accoppiamento che facilitano la mappatura dei geni che controllano il fenotipo

Fonte: Balmain A, Nagase H. (1998), *Cancer resistance genes in mice: models for the study of tumour modifiers*, *Trends Genet.* 4, 139-44

tere di risoluzione, consentendo l'identificazione dei geni candidati, la loro localizzazione cromosomica e la possibilità di saggiare l'effetto di singoli geni su uno specifico carattere (fenotipo), la prova definitiva per l'identificazione di un gene candidato. Il topo offre notevoli vantaggi come modello sperimentale. Contrariamente ad altri organismi geneticamente manipolabili, come vermi e mosche, i topi, dopo esposizione ad agenti cancerogeni ambientali, possono sviluppare tumori negli stessi tessuti e con un processo a più stadi molto simile a quanto osservato negli esseri umani. Finora sono stati mappati solo una piccola quantità di loci di suscettibilità alle radiazioni e agli effetti collaterali precoci e tardivi in tessuti sani, e solo alcuni di questi sono stati tradotti in polimorfismi, cioè variazioni, di sequenza nucleotidica in un gene critico, che conferiscono una dimostrata alterazione nel rischio, per esempio geni che controllano il riparo del DNA, il ciclo cellulare, o i *pathway* apoptotici. Un interessante complemento alla mappatura dei loci a carattere quantitativo (QTL) in ceppi geneticamente puri, a elevato tasso di omozigosi essendo derivati da accoppiamenti tra consanguinei, è la mappatura di popolazioni eterogenee attraverso analisi di *linkage disequilibrium* (LD). La mappatura tramite analisi di LD associa particolari caratteri (fenotipi), quali ad esempio elevata radiosensibilità, a combinazioni di marcatori genetici o aptotipi (combinazioni di varianti di sequenza del DNA di un particolare cromosoma, in prossimità o all'interno di un *locus* di interesse, che tendono a essere trasmessi in blocco come un unico segmento). Per l'analisi di LD, devono esistere sia uno squilibrio sostanziale di un fenotipo, che un

numero sufficiente di polimorfismi (variazioni di sequenza del DNA). Sia l'analisi LD che QTL sono quindi tradizionalmente dipendenti da marcatori genetici quali polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLPs), polimorfismi di lunghezza di sequenza semplice (SSLPs) e polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs). Il LD è un importante strumento per individuare regioni cromosomiche di ampiezza limitata contenenti varianti geniche che controllano un dato fenotipo.

8 ceppi puri di topi (A/J, DBA2/J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALBc/J, C57BL6/J). Su questa popolazione fondatrice, altamente polimorfica poiché il corredo genetico di ciascun animale era costituito da un diverso riassortimento del 12,5% del genoma di ciascun ceppo progenitore, è stato applicato un protocollo di cancerogenesi cutanea chimica, seguito da allevamento selettivo bidirezionale eseguito accoppiando tra loro gli animali che più rispondevano al trattamento cancerogeno, svilup-

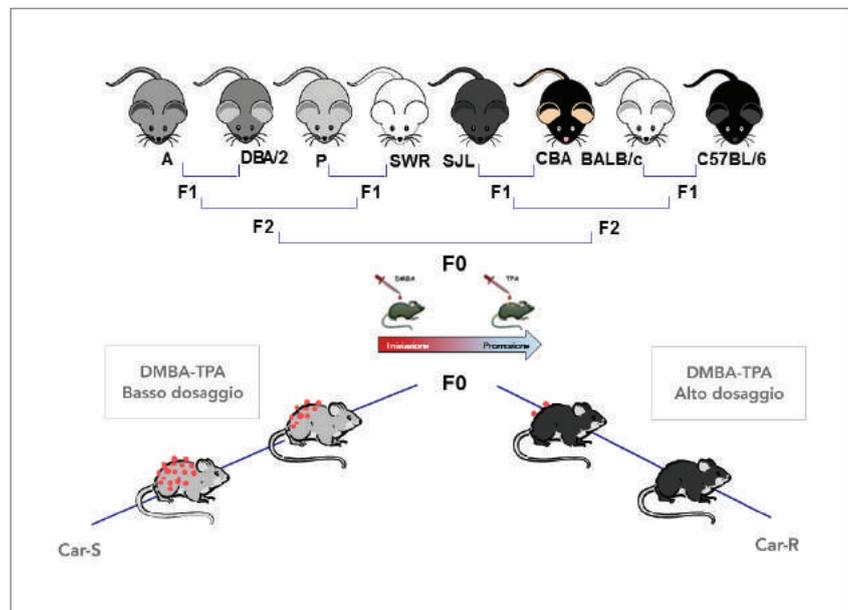


Fig. 2 Schema riepilogativo utilizzato nella selezione bidirezionale per la suscettibilità alla cancerogenesi cutanea a partire da una popolazione fondatrice (F0), generata dall'incrocio bilanciato di 8 ceppi puri di topi

Selezione del modello murino CarS/R per la suscettibilità alla cancerogenesi cutanea

Negli anni 80 nei Laboratori dell'ENEA Casaccia ha avuto inizio un programma di accoppiamenti selettivi bidirezionali a partire da una popolazione fondatrice (F0), generata dall'incrocio bilanciato di

pando molti tumori cutanei per la produzione della linea suscettibile, e gli animali con pochi o senza tumori per lo sviluppo della linea resistente. Per segregare tutti i geni di suscettibilità (linea Car-S) e di resistenza (linea Car-R) alla cancerogenesi chimica cutanea e raggiungere il limite di selezione sono state necessarie circa 18 generazioni, evidenziando il con-



tributo di un elevato numero di geni nel controllo del carattere (Figura 2). La selezione ha prodotto una differenza >100 nella suscettibilità alla risposta tumorale della cute tra le due linee. La possibilità di quantizzare il fenotipo, insieme all'elevato grado di polimorfismo, ha reso queste linee particolarmente adatte a studi di *linkage* per la mappatura dei loci modificatori della suscettibilità all'induzione di tumori cutanei.

Con questo tipo di approccio, ad esempio, nella regione distale del cromosoma 6 è stato identificato un polimorfismo nel gene che codifica per la proteina PTHrP (relata all'ormone paratiroideo) associato alla predisposizione allo sviluppo di tumori cutanei. Tale polimorfismo è responsabile di due varianti alleliche del gene, una codificante per un residuo di treonina associato alla linea resistente (Car-R), l'altra codificante per un residuo di prolina associato a quella suscettibile (Car-S). Test funzionali, quali la trasfezione di una linea cellulare di carcinoma a cellule squamose umano con DNA contenente il polimorfismo per il residuo di prolina (suscettibilità), hanno mostrato che le cellule trasfettate crescono in *cluster*, tendono ad impiantarsi e, quando inoculate in topi nudi danno tumori a crescita più veloce rispetto alle cellule non trasfettate o trasfettate con la variante codificante per il residuo di prolina, fornendo una prova diretta dell'associazione di questo polimorfismo con la suscettibilità alla cancerogenesi cutanea [1]. È importante sottolineare come i geni per il controllo della tumorigenesi cutanea segregati nelle linee Car-S/R non controllino solo la cancerogenesi cutanea, ma siano in grado di influenzare anche la tumorigenesi in altri distretti. Esperimenti effettuati incrociando animali della

linea resistente Car R con il ceppo SWR, suscettibile alla tumorigenesi del polmone, hanno dimostrato che un *subset* di alleli derivanti dalla linea Car-R, oltre alla resistenza alla tumorigenesi cutanea, può conferire anche resistenza a quella polmonare. Inoltre, la mappatura attraverso analisi di *linkage* ha anche portato all'identificazione di un *locus* sul cromosoma 1 responsabile del controllo della predisposizione sia alla tumorigenesi cutanea che polmonare. All'interno di questo locus mappano 2 geni - Igfbp5 e Igfbp2 - appartenenti alla famiglia delle "insulin-like growth factor binding proteins", che sono maggiormente espresse negli

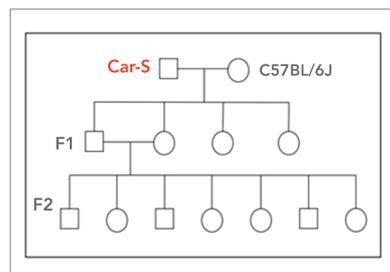


Fig. 3 Esempio di pedigree costituito dai genitori, la loro progenie di prima (F1) e di seconda generazione (F2)

animali resistenti Car-R. I nostri esperimenti hanno inoltre dimostrato che la sovraespressione dei geni Igfbp5 e Igfbp2 in linee cellulari di tumore polmonare inibisce la loro clonogenicità, a sostegno del ruolo di modificatori della tumorigenesi del polmone per questi geni [2]. Un'altra importante peculiarità del nostro modello è che i topi della linea Car-S non sono solo estremamente suscettibili agli agenti utilizzati nella selezione (DMBA/TPA), ma anche ad iniziatori e promotori chimicamente non correlati [3], rendendo il modello di più ampio interesse. In aggiunta, i loci di suscetti-

bilità/resistenza alla cancerogenesi cutanea delle linee Car-S/R, controllano parzialmente anche la risposta alle radiazioni ionizzanti, poiché l'esposizione alle radiazioni è in grado di indurre tumori cutanei in animali Car-S ma non in Car-R [4].

L'impiego della linea murina Car-S per la dissezione genetica della fibrosi cutanea da radiazioni

La radioterapia è un trattamento loco-regionale con effetti collaterali a carico dell'area trattata. La cute è una delle aree più comuni per il danno da radiazioni, a causa di risposte infiammatorie e fibrotiche. La tolleranza della pelle è spesso un fattore limitante in radioterapia. La severità della risposta cutanea, anche per protocolli di trattamento simili, può variare da paziente a paziente e arrivare fino a compromissioni gravi della funzione del tessuto [5], suggerendo che fattori genetici influenzino in maniera significativa la radiosensibilità della pelle. Nell'uomo, però, l'identificazione di variazioni genetiche causali che modulano la risposta del tessuto alle radiazioni è complessa a causa dell'elevata eterogeneità genetica e di fattori ambientali non controllati. Studi eseguiti nel topo offrono molti vantaggi, compresa la possibilità di generare progenie in numero sufficiente e geneticamente ben definita, di controllare i fattori ambientali e poter quantizzare accuratamente il fenotipo. Nella linea murina Car-S la suscettibilità alla cancerogenesi cutanea è fortemente associata ad una elevata risposta infiammatoria [6]. Proprio quest'ultima caratteristica ha suggerito l'impiego della linea Car-S per uno studio finanziato dall'Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC), che ha come obiet-

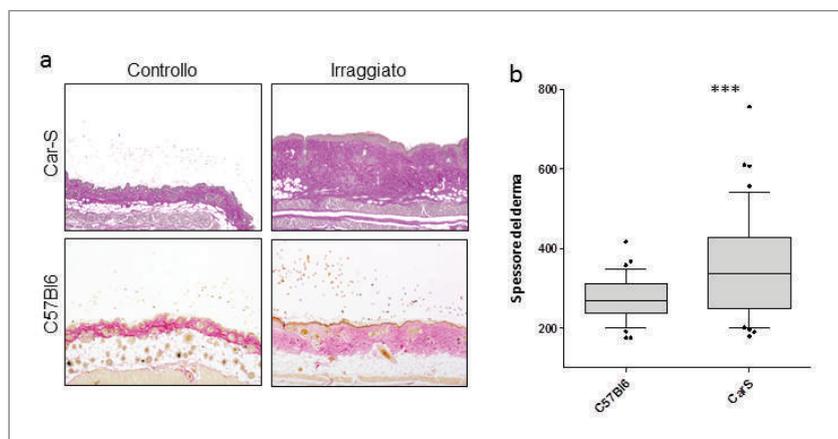


Fig. 4 Analisi della fibrosi cutanea dopo colorazione VanGieson in animali della linea suscettibile Car-S e del ceppo resistente C57Bl6 di controllo o irraggiati (a) e misura dello spessore del derma (b)

tivo l'identificazione delle cause genetiche della differente suscettibilità all'insorgenza di fibrosi cutanea da radiazioni dopo trattamenti radio-terapici.

La strategia sperimentale del progetto ha previsto la generazione di *pedigree* di 2 generazioni (alberi genealogici; Figura 3) e l'analisi fenotipica, cioè la caratterizzazione della risposta cutanea ad una dose molto elevata di raggi X (40 Gy) somministrata alla cute dorsale, eseguita tramite colorazione di VanGieson (Figura 4a) e valutazione dello spessore del derma (Figura 4b) nella progenie derivante da un incrocio tra animali suscettibili (Car-S) e resistenti (C57Bl6) alla

fibrosi cutanea da radiazioni. Ogni *pedigree* è costituito dai ceppi parentali (genitori), la loro progenie di prima generazione (F1) e dalla seconda generazione (F2), ottenuta dall'accoppiamento fratello-sorella dei topi della generazione F1.

Lo studio prevede anche un'analisi genotipica ad alta densità delle popolazioni prodotte che, utilizzando un numero elevato di marcatori genetici del DNA (n = 1500 circa), garantirà una copertura dell'intero genoma ad alta risoluzione, soprattutto grazie all'elevato grado di polimorfismo della linea Car S in cui ogni cromosoma può essere considerato un fine mosaico genetico dei ceppi fondatori. Una forte associazione tra un

dato marcatore genetico e il carattere in esame, ad esempio ispessimento cutaneo, indicherà che nella regione cromosomica adiacente al marcatore si trova un *locus* che controlla quel carattere, fornendo l'opportunità di mappatura ad alta risoluzione e la successiva analisi dei geni candidati associati alla fibrosi cutanea radio-indotta. Una volta identificati, i geni candidati saranno infatti sottoposti a validazione tramite caratterizzazione funzionale eseguita per mezzo di sovraespressione o silenziamento in linee cellulari di fibroblasti che saranno successivamente valutate per la deposizione di collagene dopo irraggiamento.

Conclusioni

L'impiego di un modello animale basato sulla segregazione di geni rilevanti per la modulazione della suscettibilità genetica alla fibrosi cutanea associata alla radioterapia è vantaggioso per l'identificazione dei loci che controllano la fibrosi cutanea radioindotta, e può avere importanti implicazioni sulla valutazione della risposta individuale, della prognosi e della personalizzazione dei parametri di dose in pazienti sottoposti a radioterapia.

Per saperne di più:
simonetta.pazzaglia@enea.it

BIBLIOGRAFIA

1. G. Manenti, B. Peissel, M. Gariboldi, F.S. Falvella, D. Zaffaroni, B. Allaria, S. Pazzaglia, S. Rebessi, V. Covelli, A. Saran, T.A. Dragani (2000), A cancer modifier role for parathyroid hormone-related protein, *Oncogene*, 47:5324-8
2. A. Saran, D. Zaffaroni, S. Pazzaglia, B. Peissel, F. Galbiati, M. Spinola, G. Manenti, N. Zanesi, S. Rebessi, M. Mancuso, V. Covelli, T.A. Dragani (2002), Inhibition of both skin and lung tumorigenesis by Car-R mouse-derived cancer modifier loci, *Int J Cancer*, 5:580-3
3. A. Saran, S. Pazzaglia, S. Rebessi, Y. Bouthillier, C. Pioli, V. Covelli, D. Mouton, G. Doria, G. Biozzi (1999), Skin tumorigenesis by initiators and promoters of different chemical structures in lines of mice selectively bred for resistance (Car-r) or susceptibility (Car-s) to two-stage skin carcinogenesis, *Int J Cancer*, 3:335-40
4. S. Pazzaglia, M. Mancuso, S. Rebessi, V. Di Majo, M. Tanori, G. Biozzi, V. Covelli, A. Saran (2002), The genetic control of chemically and radiation -induced skin tumorigenesis: a study with carcinogenesis-susceptible and carcinogenesis-resistant mice, *Radiat Res*, 1:78-83
5. H. Li, Y. You, C. Lin, M. Zheng, C. Hong, J. Chen, D. Li, W.W. Au, Z. Chen (2013), XRCC1 codon 399Gln polymorphism is associated with radiotherapy- induced acute dermatitis and mucositis in nasopharyngeal carcinoma patients, *Radiat Oncol*, 8:31-6
6. A. Galvan, F. Vorraro, W.H. Cabrera, O.G. Ribeiro, S. Pazzaglia, M. Mancuso, A. Zolin, S. Milani, A. Saran, O.M. Ibañez, T.A. Dragani (2010), Genetic heterogeneity of inflammatory response and skin tumorigenesis in phenotypically selected mouse lines, *Cancer Lett.*, 1:54-8

Papillomavirus umano (HPV) e cancro: nuove strategie terapeutiche e diagnostiche

Il *Papillomavirus* umano (HPV) di tipo 16 è causa del carcinoma del collo dell'utero. Da diversi anni sono disponibili vaccini profilattici e saggi molecolari per diagnosticare l'infezione. Le nuove sfide sono rappresentate da nuovi vaccini preventivi/terapeutici e metodi diagnostici mirati per il controllo dei vari tumori associati a HPV 16

DOI 10.12910/EAI2017-048

di **Rosella Franconi** e **Silvia Massa**, ENEA; **Aldo Venuti** e **Luciano Mariani**, Istituti Fisioterapici Ospitalieri-Istituto Nazionale Tumori Regina Elena (IFO-IRE); **Luisa Accardi** e **Paola di Bonito**, Istituto Superiore di Sanità

I genotipi definiti ad alto rischio oncogeno (*high risk* HR) del *Papillomavirus* umano (HPV), in particolare il tipo 16 (HPV 16), sono responsabili non solo del 99% dei tumori della cervice e di altri tumori ano-genitali ma anche di un sottogruppo di tumori dell'orofaringe della donna e dell'uomo per i quali non esiste una terapia specifica e risolutiva. Il virus (Figura 1, immagine a sinistra) causa lesioni tipiche intraepiteliali che in un piccolo numero di casi diventano persistenti, possono trasformarsi in carcinoma *in situ* e, successiva-

mente, in carcinoma invasivo [1]. A causa dell'impossibilità di isolare e coltivare *in vitro* i *Papillomavirus*, gli studi sulla patogenesi virale sono cominciati solo negli anni 80 con l'avvento delle tecniche di ingegneria genetica e hanno avuto un enorme incremento negli anni 90, periodo in cui si è riusciti a diagnosticare l'infezione virale e a poter progettare vaccini profilattici e terapeutici. Dopo un trentennio di studi, la prevenzione delle infezioni da HPV è stata possibile grazie a vaccini ricombinanti composti da particelle virali prive di genoma (*Virus-Like*

Particles, VLP) prodotte in cellule di lievito e di insetto (Figura 1, immagine a destra). Tali vaccini sono offerti gratuitamente nel nostro Paese dal 2007 alle ragazze di 12 anni d'età, secondo quanto stabilito dalle auto-

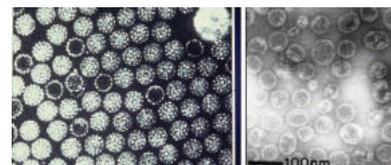
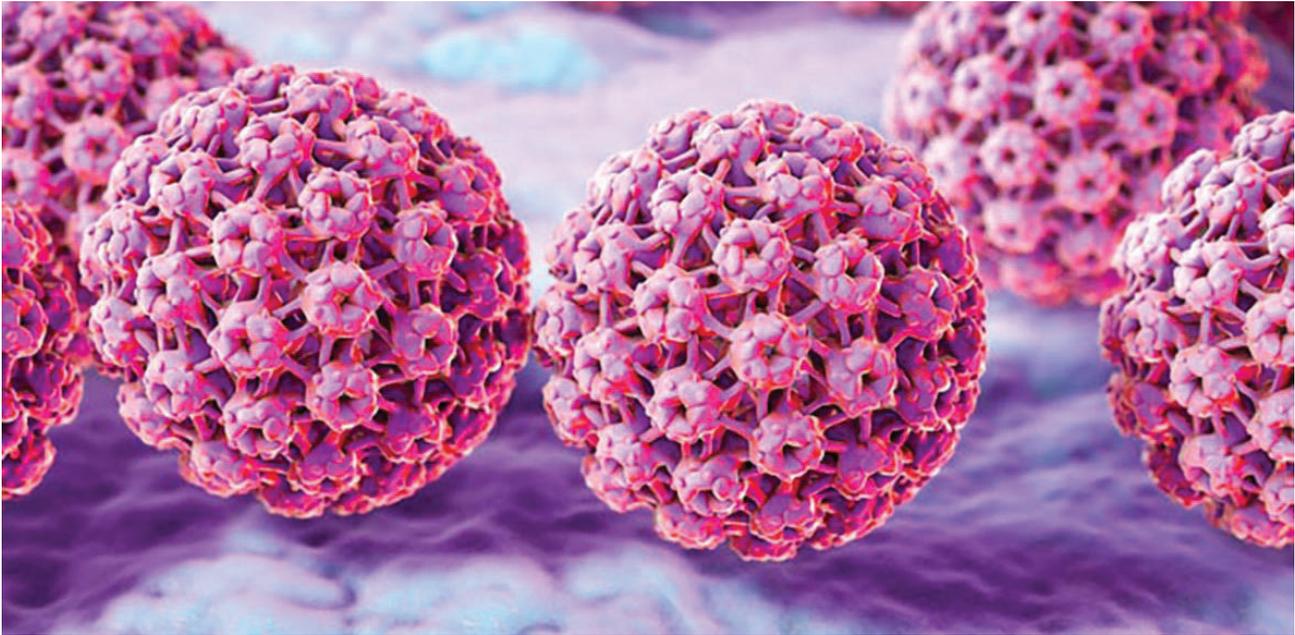


Fig. 1 Immagini di microscopia elettronica dal repertorio IFO-IRE. A sinistra: particelle di Papillomavirus (HPV) purificate; a destra: *Virus like particles* (VLPs) prodotte in lievito



rità sanitarie regionali e, a partire da quest'anno, anche alla popolazione maschile della medesima età. Se nei Paesi occidentali la vaccinazione organizzata negli adolescenti è diventata una realtà, invece nei Paesi in via di sviluppo c'è ancora molto da fare, specie in considerazione degli alti costi di produzione, della schedula di vaccinazione (2 o 3 dosi in relazione all'età) e della catena del freddo per la conservazione. Laddove la vaccinazione HPV ha raggiunto alti livelli di adesione nella popolazione *target* (>50%) sono già evidenti i benefici in termini di riduzione della prevalenza di infezione, crollo della diagnosi di condilomi genitali e sensibile riduzione delle lesioni pretumorali (CIN 2-3) della cervice uterina. In più, l'alta adesione comporta anche la comparsa del fenomeno dell' *herd-immunity*, per cui parte della popolazione non-vaccinata (di entrambi i sessi, per lo più coetanei delle vaccinate) beneficia in termini di protezione dalle patologie da HPV. La prevenzione del carcinoma del

collo dell'utero si realizza nel nostro Paese mediante lo screening con il 'Papanicolaou test' (Pap test, in Italia con carattere di programma organizzato dalla metà degli anni 90) o con HPV-DNA test (diventato recentemente il test di prima scelta e che dal 2018 sostituirà il Pap test in tutte le regioni italiane), che permettono di individuare le donne con lesioni HPV-correlate della cervice uterina a rischio di progressione. L'identificazione e la cura di queste lesioni (CIN 2-3) consentono di interrompere la storia naturale che, se lasciata a sé, può sfociare nel carcinoma invasivo. Nonostante l'esistenza di misure preventive efficaci, i tumori anogenitali causati dai *papillomavirus* ad alto rischio (HR-HPV) sono ancora un grave problema sanitario. Il cancro del collo dell'utero rappresenta il 3° cancro più comune nelle donne nella fascia 15-44 anni. In Italia, vengono diagnosticati ogni anno poco meno di 3.000 nuovi casi di carcinoma cervicale e oltre 1000 donne muoiono per questo tumore. A livello globale,

le stime più recenti registrano ogni anno circa 528.000 nuovi casi di cancro cervicale con 266.000 decessi di cui l'87% si verifica nei Paesi meno sviluppati (Figura 2)¹. È stato inoltre stimato che HPV è l'agente causale del 5% di tutti i tumori a livello globale.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che la prevalenza delle infezioni da HPV sia compresa nell'intervallo 9-30%, in relazione all'area geografica, alla tipologia di popolazione esaminata ed al metodo di rilevamento (tipo di test utilizzato), con circa 630 milioni di persone infettate dai vari genotipi di HPV. Le infezioni da HPV 16 sono comuni nella popolazione sessualmente attiva, ma i tumori correlati al virus sono comunque un evento raro che si verifica dopo che il genoma virale si è integrato accidentalmente nel genoma umano a livello dei cheratinociti basali. Si ritiene che l'integrazione di HPV, un processo complesso con meccanismi non del tutto chiariti, interrompa il controllo

del ciclo cellulare e generi infezioni persistenti. In questo contesto, l'espressione anomala di due proteine virali, E6 ed E7, causa un'alterazione delle attività di due proteine che svolgono il ruolo di soppressori dei tumori, p53 e pRb, spingendo i cheratinociti infettati da HR-HPV verso la trasformazione neoplastica. Le

utilizzato sul mercato mondiale un nuovo vaccino nonavalente, diretto cioè specificatamente verso nove genotipi virali che si affianca a quelli storici: bivalente (contro HPV 16 e 18) e quadrivalente (contro HPV 6, 11, 16 e 18). Le sfide per il futuro però sono rappresentate da una nuova tipologia di vaccini di 'seconda' e

possibilità di usare le piante per la produzione di vaccini terapeutici contro le patologie associate ad HPV risale al 2002, quando l'oncoproteina E7 di HPV 16 è stata prodotta in piante di tabacco tramite il virus X della patata (PVX) (Figura 3). I topi vaccinati con l'estratto vegetale hanno svi-

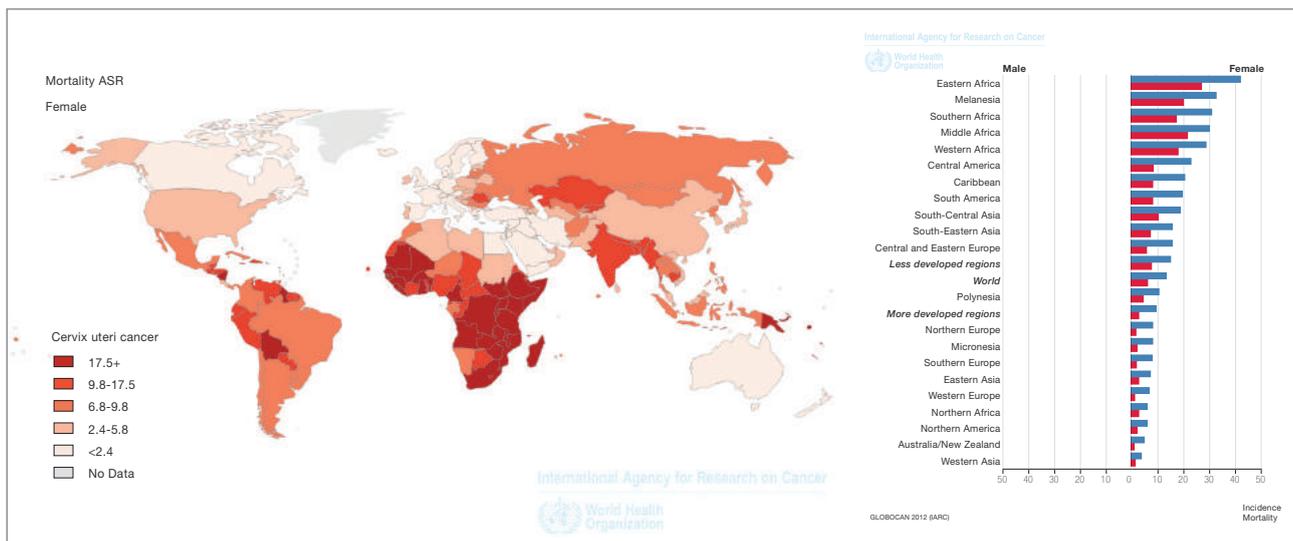


Fig. 2 Cancro del collo dell'utero a livello globale. Tassi stimati di mortalità (normalizzati per età, su 100.000)
Fonte: modificata da Globocan 2012 (IARC)

proteine E6 ed E7 di HPV 16, oggetto di numerosissimi studi, agiscono come proteine oncogene *in vivo* e *in vitro* a causa della loro interazione con numerose proteine intracellulari. E6 ed E7 sono anche antigeni tumore-specifici (TSA) e quindi rappresentano bersagli ideali per interventi di immunoterapia. Molti vaccini terapeutici sono stati sviluppati e sperimentati in modelli animali per la cura delle lesioni precancerose e dei tumori correlati a HPV 16. Alcuni di questi sono stati anche sperimentati sull'uomo e potrebbero entrare a breve sul mercato [2]. Come evoluzione dei vaccini di prima generazione, è già disponibile ed

'terza' generazione, a basso costo, a più ampia copertura verso i diversi tipi di HPV, termostabili, somministrabili possibilmente in singola dose e, magari, senza siringhe. I ricercatori di ENEA, ISS e IFO-IRE fin dal 1999 hanno iniziato a collaborare per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici e diagnostici per i tumori associati a HPV.

Vaccini terapeutici di nuova generazione

- *Piante come biofabbriche (Molecular Farming) per lo sviluppo di vaccini per HPV 16*
La prima dimostrazione della

luppato una risposta immunitaria E7-specifica (mediata sia da anticorpi sia da cellule) in grado di inibire lo sviluppo del tumore [3]. Questi studi hanno inoltre suggerito che il 'vaccino verde' è dotato di intrinseche proprietà adiuvanti (immunostimolanti) conferite dagli estratti di foglia. E7 forma dei complessi con componenti della pianta e, studi su cellule dendritiche umane, hanno confermato che gli estratti di foglia di *N. bentamiana* influenzano l'uptake di E7 da parte delle cellule, avviando la stimolazione del sistema immunitario. Successivamente, la proteina E7 è stata espressa in altri sistemi

vegetali (microalghe, colture di radici *in vitro*), anche come proteina di fusione con proteine ad attività immunostimolante, e purificata. La vaccinazione di topi con la proteina purificata da pianta ha determinato la regressione di tumori già stabilizzati nel 100% degli animali anche in un nuovo modello animale sviluppato da IFO-IRE per i tumori orofaringei associati a HPV 16 [4].

- *Vaccini per HPV 16 in forma particolata e nuovi sistemi di 'delivery'*

Per la realizzazione di vaccini terapeutici abbiamo utilizzato anche sistemi di espressione in forma particolata e altri sistemi di *delivery*. La proteina E7 di HPV 16, espressa in batterio e rinaturata *in vitro*, si auto-assembla in particelle nano- e micro-metriche che, somministrate come vaccino nel topo, inducono una potente risposta antitumorale che impedisce l'attecchimento di un tumore HPV 16-dipendente. Allo scopo di sviluppare un vaccino monodose a lento rilascio di antigene, E7 di HPV 16 è stata adsorbita su particelle lamellari aminolizzate di poli-lattide (APLLA), un polimero dell'estere dell'acido lattico biocompatibile e biodegradabile il cui impiego nell'uomo è già stato autorizzato. Le particelle E7-APLLA sono altamente immunogeniche e generano nel topo un'immunità antitumorale più potente di quella generata dalla proteina da sola.

Un'altra strategia è stata quella di veicolare le oncoproteine E7 ed E6 negli esosomi, grazie alle proprietà molecolari e all'azione cargo di Nef7, un mutante della proteina Nef di HIV-1 (caratterizzato dal Dott. M Federico, ISS). Grazie a Nef7, i prodotti di fusione veicola-

ti negli esosomi, sono in grado di cross-presentare tali antigeni alle cellule del sistema immunitario e stimolare una risposta citotossica specifica. La somministrazione degli esosomi contenenti le proteine di fusione Nef-E7 o Nef-E6, oppure i rispettivi plasmidi codificanti, sono in grado di bloccare la crescita di un tumore associato a HPV 16 [5].

- *Vaccini genetici potenziati dall'impiego di sequenze da proteine vegetali*

I vaccini genetici sono in uso clinico da qualche anno e si basano sulla somministrazione della sequenza di DNA che codifica l'antigene di interesse con un procedimento simile alle comuni tecniche di vaccinazione (ad es. per via intramuscolare): il plasmide utilizzerà i meccanismi cellulari dell'ospite per la produzione dell'antigene che a sua volta stimolerà nell'organismo una risposta immunitaria. Allo stato attuale della ricerca, uno dei problemi principali da risolvere con i vaccini genetici (sia preventivi che terapeutici) è la loro scarsa capacità di indurre una risposta immunitaria adeguata (produzione di anticorpi e/o risposte mediate da cellule). In un

approccio di immunoterapia per i tumori associati ad infezione da HPV, una versione 'disarmata' del gene codificante l'oncoproteina E7 di HPV 16 è stata fusa all'estremità N-terminale della sequenza codificante per una proteina di difesa vegetale mutata (saporina) di *Saponaria officinalis* (Figura 4A), un *carrier* capace di indurre risposte immunitarie citotossiche efficaci nell'inibire la crescita di un tumore sperimentale (Figura 4B2).

Inoltre, di recente abbiamo dimostrato che un vaccino genetico, basato sulla fusione di una sequenza segnale di una proteina vegetale con una sequenza di DNA di un antigene di HPV è in grado di generare una risposta anticorpale rapida, robusta e duratura in animali da laboratorio³. Tale strategia vaccinale, potenziata dall'associazione con l'elettroporazione, potrebbe essere utile per prevenire anche le infezioni da virus emergenti o riemergenti (es. SARS-CoV, Zika, influenza) [6].

La scoperta delle proprietà di tali sequenze di origine vegetale in grado di incrementare, in un caso le risposte immunologiche mediate da cellule (utili nel caso di tumori) e, nell'altro, risposte mediate da anticorpi (utili nel caso di infezioni), insieme

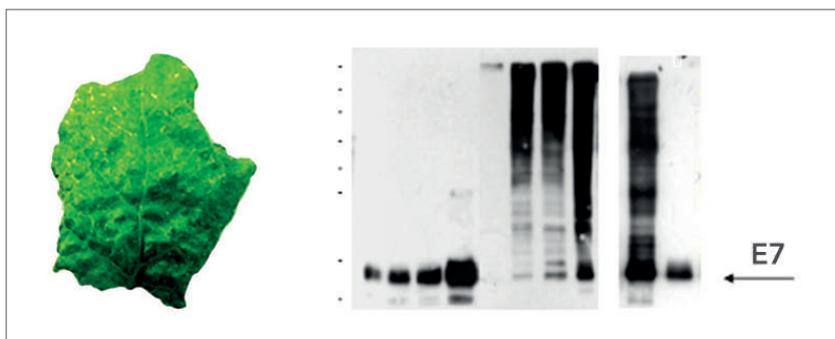


Fig. 3 Oncoproteina E7 di HPV 16 prodotta in piante di tabacco tramite il virus X della patata (PVX)

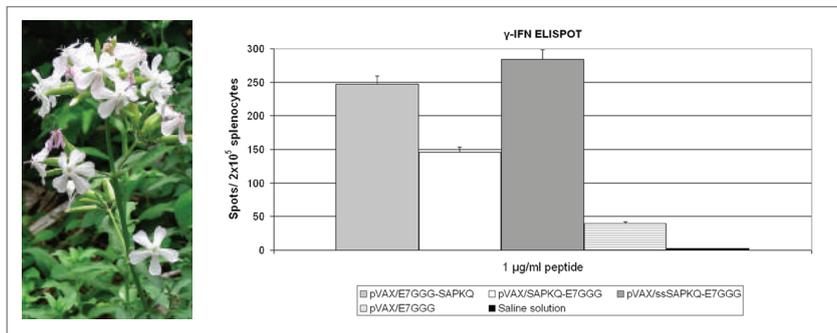


Fig. 4 a) *Saponaria officinalis*, specie spontanea fotografata presso il Centro Ricerche ENEA Casaccia e da cui deriva il gene codificante la saporina attenuata (SAPKQ) per il vaccino terapeutico anti-HPV
 b) Miglioramento della risposta immunitaria mediata da cellule suscitate nel modello animale a seguito di vaccinazione con il vaccino genetico contenente la sequenza vegetale SAPKQ

all'impiego di tecnologie a basso costo (vaccini a DNA) permette lo sviluppo di una piattaforma 'verde' che potrebbe essere generalmente valida per la generazione di nuovi vaccini profilattici e/o terapeutici efficaci. Le sequenze ad attività immuno-stimolante di origine vegetale sono inoltre più sicure di quelle di derivazione umana o batterica che potrebbero indurre reazioni secondarie, reazioni crociate o autoimmuni (rischio intrinseco di altre strategie utilizzate per la stessa classe di farmaci dove l'antigene tumore-specifico è fuso con sequenze di proteine umane quali HSPs, calreticolina o citochine).

Anticorpi intracellulari per la terapia delle lesioni associate a HPV 16

Un altro approccio innovativo in studio per la terapia delle lesioni associate a HPV si basa sull'utilizzo di anticorpi intracellulari (*intrabodies*) contro le proteine oncogene di HPV. Si tratta di anticorpi ricombinanti in formato a singola catena (scFv) espressi all'interno delle cellule contenenti il genoma di HPV per bloc-

care o de-localizzare il loro *target* intracellulare, sovvertendo i *pathways* coinvolti nel controllo della proliferazione e della sopravvivenza cellulare, e ostacolare la trasformazione tumorale delle cellule infette (Figura 5). Attraverso metodologie quali la *Phage display technology* e la *Intracellular Antibody Capture Technology* (IACT), che consentono di identificare ligandi specifici per antigeni di

interesse da repertori sintetici ad alta diversità, abbiamo isolato scFvs specifici per le oncoproteine E6 ed E7 di HPV 16. Il formato scFv è estremamente versatile grazie alla elevata specificità verso l'antigene, le dimensioni ridotte a fronte di una capacità di legame conservata, e la possibilità di essere ingegnerizzato per acquisire proprietà rilevanti o costituire la matrice di anticorpi di diverso formato da utilizzare in ambito sia diagnostico che terapeutico.

Gli scFvs da noi selezionati e caratterizzati, una volta modificati ed espressi come *intrabodies* in compartimenti specifici delle cellule tumorali HPV 16-positive, sono stati in grado di contrastare l'attività dei loro bersagli molecolari, con l'esito finale di inibire la proliferazione cellulare e ripristinare l'apoptosi. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'espressione di questi scFvs è in grado di prevenire lo sviluppo di tumori associati a HPV 16 in modelli pre-clinici [7].

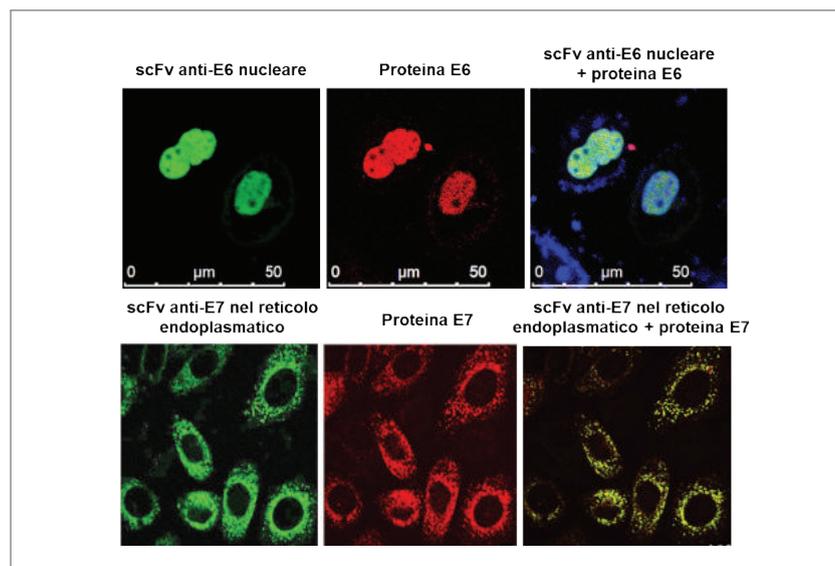


Fig. 5 Immunofluorescenza degli 'intrabodies' scFv (in verde) e delle oncoproteine E6 ed E7 (in rosso) al microscopio confocale: E6 ed il rispettivo anticorpo co-localizzano nel nucleo cellulare (in blu); E7 ed il rispettivo anticorpo co-localizzano nel reticolo endoplasmatico

Nuovi sistemi diagnostici

Poiché non tutte le infezioni da HR-HPV progrediscono in tumore, il rilevamento del virus tramite HPV-DNA test non è indicativo di una eventuale progressione tumorale. Al contrario, le oncoproteine E6 ed E7, essendo necessarie per l'induzione ed il mantenimento della cancerogenesi indotta da HPV, rappresentano dei marcatori ideali per lo sviluppo di sistemi diagnostici potenzialmente in grado di distinguere tra le infezioni transitorie e quelle orientate verso il processo di carcinogenesi. In particolare, l'oncoproteina E6 di

HPV 16 è stata identificata come un bio-marcatore precoce per i tumori orofaringei associati a HPV (in forte aumento) dove la presenza di anticorpi contro tale proteina è rilevabile con 10 anni di anticipo rispetto alla diagnosi.

Abbiamo sviluppato una metodica innovativa per la produzione della proteina E6 di HR-HPV (tipi 16 e 18) in forma solubile, stabile e biologicamente attiva⁴ e stiamo lavorando per lo sviluppo di un sistema diagnostico di facile utilizzo e che potrebbe fornire indicazioni importanti per la diagnosi o la scelta del piano di intervento terapeutico in tutta un'altra

serie di tumori associati ad HPV, quali i tumori della regione anale e dell'orofaringe.

Conclusioni

Le ricerche condotte in collaborazione tra i nostri Istituti, sebbene abbiano ricevuto scarsissimi finanziamenti, hanno prodotto risultati riconosciuti a livello internazionale e aprono la strada alla sperimentazione clinica delle varie formulazioni da noi realizzate (vaccini genetici e proteici, anticorpi intracellulari, antigeni) come possibili strumenti contro i tumori associati ad infezione da HPV.

¹ Globocan 2012, IARC, <http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp#TOP>

² Franconi R, Massa S Spanò L, Venuti A., Vaccines based on genetic chimera of viral and/or tumoral antigens and plant proteins Brevetto italiano 1394887. Brevetto Europeo EP2456785. Notificato in Italia, Francia e Germania

³ Franconi R, Massa S, Venuti A. *Plant protein signal sequence as adjuvant in DNA vaccines. Patent pending*

⁴ Franconi R, Illiano E. Proteina E6 di HPV ricombinante, solubile e in forma biologicamente attiva, procedimento per la sua preparazione, usi e vaccini terapeutici che la comprendono. Brevetto italiano 1379103 licenza esclusiva a Nanofaber Srl (Spin-off ENEA)

BIBLIOGRAFIA

1. H. zur Hausen (2002). Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* **2**(5):342-50
2. A. Yang, Farmer E, Wu TC, Hung CF (2016). Perspectives for therapeutic HPV vaccine development. *J Biomed Sci* **23**(1):75
3. R. Franconi, P. Di Bonito, F. Dibello, L. Accardi, A. Muller, A. Cirilli, P. Simeone, G. Donà, A. Venuti, C. Giorgi (2002). *Plant-derived Human Papillomavirus 16 E7 oncoprotein induces immune response and specific tumor protection. Cancer Research* **62**: 3654-58
4. A. Venuti, G. Curzio, L. Mariani, F. Paolini (2015). Immunotherapy of HPV-associated cancer: DNA/plant-derived vaccines and new orthotopic mouse models. *Cancer Immunol Immunother.* **64**(10):1329-38
5. P. Di Bonito, C. Chiozzini, C. Arenaccio, S. Anticoli, F. Manfredi, E. Olivetta, F. Ferrantelli, E. Falcone, A. Ruggieri, M. Federico (2017). Antitumor HPV E7-specific CTL activity elicited by in vivo engineered exosomes produced through DNA inoculation. *International Journal of Nanomedicine* **12**:4579-4591
6. S. Massa, F. Paolini, G. Curzio, M.N. Cordeiro, E. Illiano, O.C. Demurtas, R. Franconi, A. Venuti (2017). A plant protein signal sequence improved humoral immune response to HPV prophylactic and therapeutic DNA vaccines. *Hum Vaccin Immunother* **13**(2):271-282
7. C. Amici, M. Visintin, F. Verachi, F. Paolini, Z. Percario, P. Di Bonito, A. Mandarino, E. Affabris, A. Venuti, L. Accardi (2016). A novel intracellular antibody against the E6 oncoprotein impairs growth of human papillomavirus 16-positive tumor cells in mouse models. *Oncotarget* **7**(13):15539-53

Utilizzo di nuove tecnologie omiche per lo studio di patologie umane

miRNoma e metabolomica: nuovi approcci per la comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nello sviluppo di tumori cerebrali

DOI 10.12910/EAI2017-049

di **Barbara Tanno, Simona Leonardi e Mariateresa Mancuso**, ENEA; **Antonella Rosi, Sveva Grande e Alessandra Palma**, Istituto Superiore di Sanità

Nell'ultimo ventennio, la capacità di studiare i sistemi cellulari e molecolari è stata completamente rivoluzionata attraverso lo sviluppo delle scienze omiche [1]. Esse analizzano, nel loro insieme:

- i geni del DNA (genomica) e le loro funzioni (genomica funzionale);
- i trascritti del DNA, cioè l'RNA (trascrittomica e analisi del miRNoma);
- le proteine (proteomica);
- i metaboliti all'interno di un organismo (metabolomica);
- le reversibili modificazioni del DNA o delle proteine associate al DNA (epigenomica).

La diffusione delle discipline omiche è stata resa possibile principalmente grazie allo sviluppo di tecniche di indagine *high-throughput* in grado di generare enormi quantitativi di dati relativi ai diversi livelli gerarchici di complessità biologica (DNA, mRNA, proteine, metaboliti ecc.), contribuendo a rivoluzionare l'approccio allo studio dei sistemi complessi. A ciò si sono associate una molteplicità di piattaforme tecnologiche in grado di consentire livelli di produttività e costi di analisi inimmaginabili con le tecniche tradizionali. Tutto questo ha portato a una rivoluzione nel campo della ricerca biomedica, con un approccio olistico al problema biologico.

Un settore di ricerca strategico è quello rappresentato dall'applicazione delle tecnologie omiche per una sempre più approfondita conoscenza dei meccanismi molecolari che determinano l'insorgenza delle patologie tumorali. Tra queste, quelle cerebrali, per cui è nota la resistenza alle terapie convenzionali e l'alta incidenza di recidive, rappresentano certamente la categoria di tumori per cui è urgente identificare nuove strategie terapeutiche.

Approcci omici innovativi: l'analisi del miRNoma

Con l'avvento di un gran numero di studi di trascrittomica è stato ne-



cessario rivalutare il dogma centrale della biologia che identificava l'RNA come una molecola intermedia tra il DNA e le proteine. Dati recenti hanno dimostrato che solo circa il 3% del genoma codifica per proteine, mentre circa l'80% non è trascritto. Così se gli RNA messaggeri hanno il compito di trasportare le informazioni contenute nei geni per la produzione delle proteine, la restante percentuale del genoma, che potrebbe sembrare un insieme di "parole" senza senso, svolge invece un importante ruolo strutturale oltre ad avere il compito di modulare finemente e in modo transitorio l'espressione genica. La diffusione e il miglioramento delle tecnologie di caratterizzazione molecolare a cui abbiamo assistito in questi ultimi anni ci ha permesso di identificare molte migliaia di piccole molecole di RNA

non tradotte (non-coding RNA, microRNA, *piwi-interacting* RNA, and *small nuclear* RNA) con ruoli essenziali in molti processi fisiologici e patologici.

I microRNA (miRNA) sono piccoli frammenti di RNA (di ~22 nucleotidi di lunghezza) non codificanti che regolano l'espressione genica legandosi a specifici mRNA bersaglio promuovendone la loro degradazione e/o l'inibizione della traduzione. Il genoma umano codifica per centinaia di miRNA che svolgono la loro attività di silenziamento su un'ampia gamma di trascritti derivanti dall'espressione di migliaia di geni [2]. L'espressione aberrante dei miRNA è implicata nell'insorgenza di numerose patologie e per questo possono essere utilizzati a scopi terapeutici.

Inoltre lo studio dei miRNA, abbastanza stabili in differenti tipi di

campioni – sangue, plasma, urine e tessuti fissati in formalina – misurabili con una maggiore sensibilità delle proteine ci permettono di eseguire una caratterizzazione molecolare accurata di diverse patologie. Queste caratteristiche suscitano un considerevole interesse nell'identificazione dei miRNA come biomarcatori per diverse applicazioni di diagnostica molecolare e in applicazioni forensi, così come nel loro potenziale utilizzo come molecole terapeutiche per malattie con un elevato impatto socio-economico (cancro, diabete, patologie cardiovascolari e neurodegenerative).

Il miRNoma nel Medulloblastoma

Il medulloblastoma (MB), il più comune tumore pediatrico del sistema nervoso centrale, origina dalle cellule precursori dei granu-

li, è fatale nel 40–70% dei casi e la sua radio-resistenza contribuisce sia alla prognosi sfavorevole che ai casi di recidiva. Delle quattro distinte varianti molecolari note di MB, quella riconducibile all'attivazione della via di segnale di *Sonic Hedgehog* (SHH), caratterizza circa il 25–30% di MB sporadici.

I topi eterozigoti per il gene *Ptch1* (*Ptch1*^{+/-}), sono uno dei più studiati e comunemente usati modelli murini di MB. In questi topi, la percentuale di MB spontaneo (circa 8%) subisce un incremento pari a 10 volte (circa 80%) in seguito a irraggiamento in età neonatale, suggerendo che la deregolazione della via di segnale di Shh sia coinvolta non solo nello sviluppo del MB ma anche nella risposta al danno indotto dalle radiazioni. Poiché un approccio strategico per superare la radio-resistenza del MB potrebbe essere quello di capire i meccanismi molecolari che controllano la risposta alle radiazioni ionizzanti nelle cellule di origine del tumore, questo modello animale è uno strumento ideale per identificare miRNA potenzialmente utilizzabili per un trattamento terapeutico mirato che coadiuvi e implementi quello radioterapico. L'utilizzo delle nuove tecnologie omiche, in particolare dei sequenziatori di seconda generazione come *Next Generation Sequencing* (NGS), ci ha permesso di eseguire un'analisi comparativa dell'intero miRNAoma (l'insieme di microRNA) per studiare contemporaneamente i diversi livelli del flusso di informazione biologica nel nostro modello sperimentale. A partire, infatti, dalle cellule precursori dei granuli prelevate dai cervelletti di animali geneticamente normali (*wildtype*, WT) e geneticamente modificati

(*Ptch1*^{+/-}) irraggiati e non, è stato possibile identificare per ciascun gruppo sperimentale più di 700 miRNA.

L'analisi bioinformatica, necessaria per analizzare l'enorme quantità di dati generati, ha permesso di identificare alcune importanti famiglie di microRNA (let-7a, mir-17, mir-34a, miR144 e mir-486, Figura 1), responsabili a loro volta della deregolazione di processi biologici alla base della tumorigenesi come senescenza, proliferazione e riparo del DNA [3]. L'utilizzo di queste metodologie per la caratterizzazione e l'analisi dei diversi livelli biologici consente di indirizzare meglio la conoscenza dei meccanismi patogenetici a livello molecolare. Ciò permette, dove possibile, di individuare dei sottogruppi di pazienti o biomarcatori che consentano di migliorare la diagnosi o addirittura pianificare delle te-

rapie personalizzate, in modo da programmare interventi farmacologici mirati ed essere in grado di migliorare le capacità diagnostiche e prognostiche.

Approcci omici innovativi: la metabolomica

La Metabolomica si occupa di analizzare alterazioni della funzionalità metabolica di sistemi biologici come biofluidi o sistemi cellulari modello (cellule in coltura e neurosfere) per la caratterizzazione di patologie del sistema nervoso, di patologie tumorali e cardiache e all'identificazione di marker diagnostici e prognostici che possano permettere una personalizzazione dei trattamenti. Numerose sono le tecniche utilizzate per studi di metabolomica: la *Fourier transform infrared spectroscopy* (FT-IR), la *Raman spectroscopy*, la spettro-

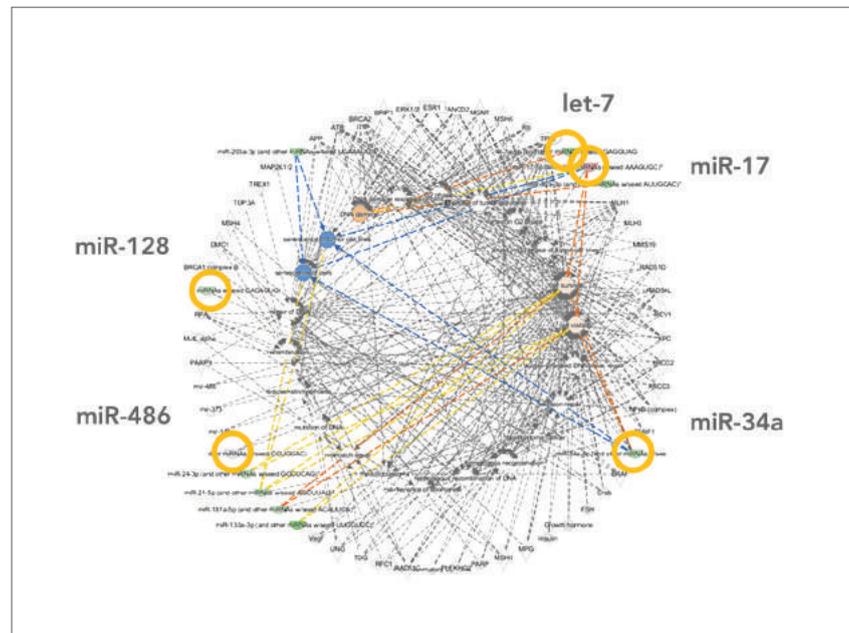


Fig. 1 Network ottenuto attraverso Ingenuity pathway analysis (IPA) utilizzando i datasets di miRNA and mRNA: nel cerchio interno, le funzioni biologiche; cerchio esterno miRNA e mRNA. Il gradiente di colore riflette la predetta forza di attivazione (arancio) o inibizione (blu)



metria di massa e la spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (MRS). L'identificazione e caratterizzazione dei profili metabolici è essenziale per la descrizione dettagliata delle interazioni tra metaboliti e per la comprensione dei cammini metabolici e della loro alterazione come risposta a stimoli esterni ed interni. Gli studi di metabolomica si applicano sia alla descrizione di patologie in essere, sia all'identificazione di stadi prepatologici (non manifesti) collegabili a fattori di rischio di insorgenza

delle malattie, cioè stati descrivibili da variabili dipendenti da alterazioni di origine genetica o ambientale che concorrono ad aumentare o a diminuire la possibilità di insorgenza di malattie e la cui conoscenza può aiutare a mettere in atto piani di prevenzione.

La metabolomica nel Glioblastoma Multifforme

Vi è sempre una maggiore evidenza del ruolo svolto dalle cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cells*,

CSC) nell'iniziazione tumorale e nelle recidive. Le CSC sono in grado di auto-rinnovarsi, proliferare, auto differenziarsi in più linee e sono di solito radio- e chemoresistenti.

Questo implica che la conoscenza dei meccanismi patogenetici a livello molecolare e metabolico delle CSC potrebbe contribuire a fornire nuove e più specifiche strategie terapeutiche. Tra le patologie tumorali, i gliomi maligni - in particolare il glioblastoma multifforme (GBM) - sono molto difficili da trattare e la prognosi è quasi sempre infausta. L'identificazione di profili metabolici, nelle linee staminali da GBM (*Glioblastoma Stem Cells*, GSCs), può fornire importanti informazioni sulla vulnerabilità o resistenza di queste cellule consentendo di pianificare terapie personalizzate. La MRS è molto spesso usato in campo clinico per studi di metabolismo, in particolare per diagnosi e prognosi di patologie tumorali. In particolare la spettroscopia RM è spesso usata per identificare profili metabolici *in vitro*, *ex vivo* ed *in vivo* anche in estratti e in tutti i fluidi biologici (urine, sangue e sue componenti, saliva ecc.) con un elevato grado di riproducibilità. Nel caso del GBM i tipici metaboliti analizzati sono: la creatina totale (tCr) e l'N-acetil aspartato (NAA) come marker di tessuto sano, composti contenenti la colina (tCho) che riflettono prodotti del processo di *turnover* della membrana plasmatica per cellule in attiva proliferazione, il lattato nella glicolisi ed i lipidi mobili come marker tumorali [4]. I nostri studi di spettroscopia 1D e 2D COSY 1H NMR, condotti su 17 linee cellulari provenienti da pazienti affetti da GBM e basati su un definito numero di metaboliti (inclusi quelli sopra citati) hanno

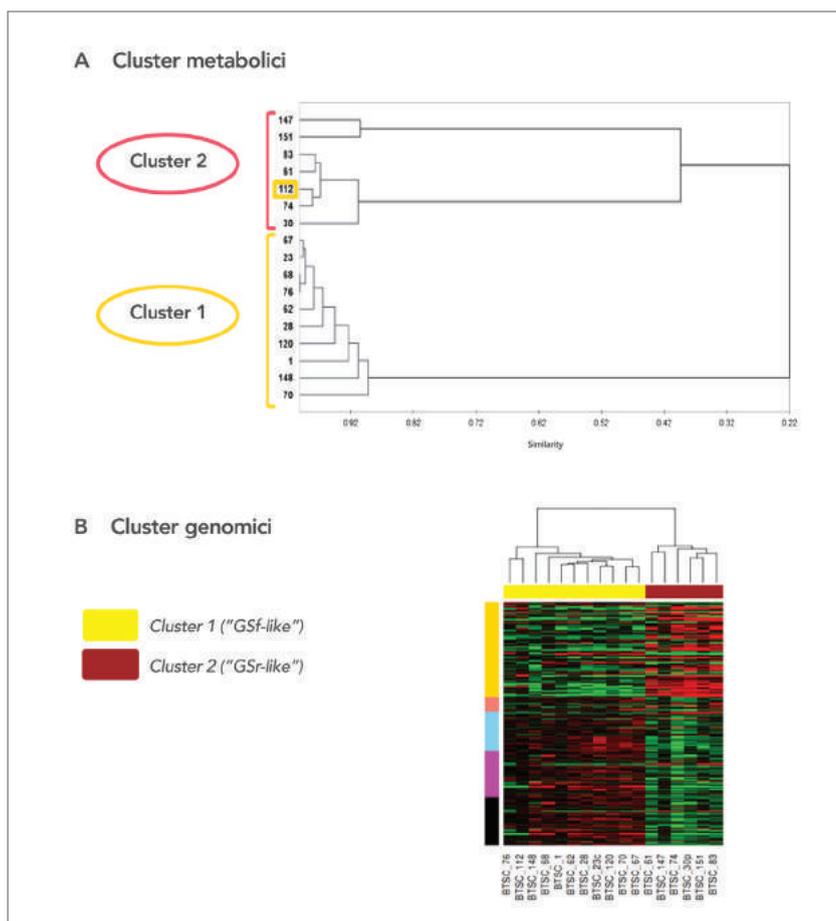


Fig. 2 (A) Analisi metabolica di 17 linee di GSCs. La Cluster analysis separa le GSCs in due cluster, cluster 1 e cluster 2. (B) La corrispondente analisi dell'espressione genica che suddivide le stesse 17 linee in due cluster genomici, GSf-like e GSr-like. I cluster genomici e metabolomici sono sovrapponibili con la sola eccezione della linea #112

permesso di caratterizzarle e classificarle, sulla base dei loro profili metabolici, in due cluster (Cluster 1 e 2) attraverso una *unsupervised cluster analysis*. I due cluster sono corrispondenti a due profili metabolici: uno di tipo neuronale/astrocitico e uno più simile ai veri e propri gliomi (Figura 2A).

È stato inoltre osservato che metabolismi differenti possono prevalere in linee diverse di GBM e che le linee del cluster 1 provengono da pazienti con una sopravvivenza più lunga rispetto a quella di pazienti le cui linee appartengono al cluster 2. Un esempio di integrazione tra tecniche omiche è presentato in un recente studio [5] il cui obiettivo era trovare una correlazione tra i risultati di metabolomica e quelli di genomica sempre su linee GSC. I dati di espressione genica ottenuti dalle stesse 17 linee di GBM sono stati analizzati mediante *cluster analysis* e hanno evidenziato due cluster genomici ben distinti di GSC (Figura 2B) che indentificano anche essi, come i dati di metabolomica, due sottoclassi di cellule tumorali.

Il fenotipo GSF è caratterizzato da una *signature* di espressione genica di tipo proneurale, (espressione di CD133, crescita come neurosfere ed elevata invasività *in vitro*), mentre le GSC con un fenotipo GSR mostrano una *signature* di espressione genica di tipo mesen-

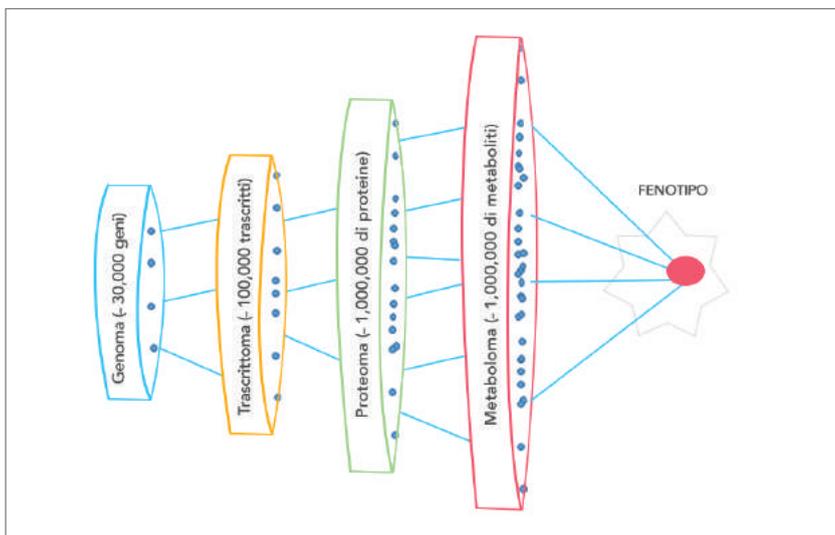


Fig. 3 Attraverso un approccio multidisciplinare ottenuto dall'integrazione di dati provenienti dalle diverse analisi omiche, è oggi potenzialmente possibile identificare lo schema molecolare (o il modello molecolare) caratteristico di una patologia (fenotipo)

chimale (assenza di espressione del CD133, crescita *in vitro* come cellule aderenti e ridotta invasività *in vivo*) [6].

Lo studio bioinformatico dell'analisi genomica suggerisce una associazione delle linee GSF-like, (subtipo proneurale), con il cluster metabolico 1 di tipo neuronale/astrocitico e delle linee GSR-like (subtipo mesenchimale) con il cluster metabolico 2 più simile ai veri e propri gliomi, confermando il valore aggiunto di studi integrati tra tecniche omiche per la comprensione di diverse patologie umane.

Conclusioni

L'integrazione di tutte le scienze e tecnologie omiche, definita "*system biology*" (Figura 3) ha avuto e avrà un impatto sempre più rilevante nella comprensione di come geni, proteine e metaboliti intervengano nei meccanismi fisiologici e fisiopatologici che stanno alla base di molte patologie umane e la loro applicazione potrà certamente avere un impatto strategico nella definizione di nuovi approcci terapeutici.

Per saperne di più:
mariateresa.mancuso@enea.it

BIBLIOGRAFIA

1. Y. Hasin, M. Seldin, A. Lusic (2017). Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology* 18:83
2. C.C. Pritchard, H.H. Cheng, M. Tewari (2012). MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.*, 13:358-369
3. B. Tanno, G. Babini, S. Leonardi, P. Giardullo, I. De Stefano, E. Pasquali, A. Ottolenghi, M.J. Atkinson, A. Saran, M. Mancuso (2016). Ex vivo miRNome analysis in *Ptch1*^{+/-} cerebellum granule cells reveals a subset of miRNAs involved in radiation-induced medulloblastoma. *Oncotarget*, 7:68253-68269
4. L. Guidoni, L. Ricci-Vitiani, A. Rosi, A. Palma, S. Grande, A.M. Luciani, F. Pelacchi, S. di Martino, C. Colosimo, M. Biffoni, R. De Maria, R. Pallini, V. Viti (2014). ¹H NMR detects different metabolic profiles in glioblastoma stem-like cells. *NMR Biomed*, 27:129-145
5. G. Marziali, M. Signore, M. Buccarelli, S. Grande, A. Palma, M. Biffoni, A. Rosi, Q.G. D'Alessandris, M. Martini, L.M. Larocca, R. De Maria, R. Pallini, L. Ricci-Vitiani (2016). Metabolic/Proteomic Signature Defines Two Glioblastoma Subtypes with Different Clinical Outcome. *Scientific Reports*, 7, DOI: 10.1038/srep21557
6. H.S. Gunther, N.O. Schmidt, H.S. Phillips, D. Kemming, S. Kharbanda, R. Soriano, Z. Modrusan, H. Meissner, M. Westphal, K. Lam-szus (2008). Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene*, 27:2897-2909

Il Progetto MOLY: una via italiana per la produzione del radiofarmaco ^{99m}Tc

L'Agenzia ENEA intende attivare una produzione di tecnezio (^{99m}Tc) attraverso l'irraggiamento neutronico nel reattore di ricerca TRIGA RC-1 Casaccia, di target di molibdeno al fine di proporre una risposta italiana alla carenza di questo fondamentale radioisotopo nella diagnostica medico-nucleare

DOI 10.12910/EAI2017-050

di **Oswaldo Aronica, Mario Carta, Mauro Olivetti, Fabrizio Pisacane, Emilio Santoro**, ENEA

La scienza e la pratica clinica della medicina nucleare interessano la somministrazione e la gestione di piccole quantità di composti marcati con radionuclidi che sono utilizzati per fornire informazioni diagnostiche su un'ampia varietà di patologie. L'utilità della medicina nucleare risiede nella sua abilità a fornire misure estremamente sensibili e precise in molti processi biologici che avvengono nel corpo umano. Accanto alle tecniche proprie della medicina nucleare esistono pratiche di *imaging* medico quali la Risonanza Magnetica, la Radiografia X e la Tomografia Computerizzata che forniscono preziose informazioni sulla anatomia,

ma sono limitate nel fornire dati sui processi biologici. Inoltre, se ci riferiamo alle concentrazioni per ml di tessuto specifiche di elementi biologici di interesse, i *range* applicativi sono tali per cui la Risonanza Magnetica, per esempio, è in grado di operare su concentrazioni millimolari, mentre le tecniche di medicina nucleare operano correntemente su concentrazioni nel *range* nanomolare o picomolare. Questo vantaggio di sensibilità, unitamente alla sempre crescente messa a punto di nuovi composti, permette a tale tecnica (con il progresso nel campo delle tecniche di misura radiometrica) di analizzare processi biologici estremamente specifici.

La medicina nucleare è usata in molti test diagnostici nei quali vengono impiegati molti tipi diversi di *radiofarmaci* (composti contenenti un isotopo radioattivo) che coprono la quasi totalità di organi del corpo umano. Tra questi il ^{99m}Tc , il cui precursore è il ^{99}Mo , è tra i radiofarmaci attualmente più usati e consente uno spettro applicativo particolarmente interessante. La diffusione di tale radioisotopo, che in Italia rappresenta il 95% dei radiofarmaci impiegati in tale campo, è dovuta essenzialmente ai seguenti fattori:

- può essere facilmente incorporato in opportune molecole leganti e proteine che, una volta iniettate



in corpo, possono concentrarsi in specifici organi e/o tessuti;

- ha una vita media di circa 6 h ed emette un fotone di energia 140 keV, facilmente rilevabile, quando decade nell'isotopo stabile ^{99}Tc .

Le prime applicazioni della radioattività per scopi medicali risalgono agli anni 1920 e 1930 e sono caratterizzate dall'utilizzo di radionuclidi naturali. La moderna medicina nucleare prevede viceversa l'uso esclusivo di radionuclidi "artificiali" ottenuti colpendo nuclei di elementi stabili mediante particelle subnucleari (tipicamente neutroni e/o protoni) che, tramite le reazioni nucleari indotte, li convertono in nuclidi instabili e quindi radioattivi. Si possono individuare e categorizzare gli attuali metodi di produzione di ^{99}Mo - ^{99m}Tc

in base alla loro disponibilità temporale e al loro grado di realizzabilità:

- Breve termine: circa 7 anni.
 - Fissione di target di uranio in reattori di ricerca con uranio ad alto e a basso arricchimento;
 - Fissione in reattori a soluzione acquosa;
 - Attivazione neutronica del ^{98}Mo in reattori nucleari di ricerca attraverso la reazione $^{98}\text{Mo}(n,\gamma)^{99}\text{Mo}$;
 - Produzione diretta di ^{99m}Tc in ciclotroni attraverso la reazione $^{100}\text{Mo}(p,2n)^{99m}\text{Tc}$.
- Medio termine: 15 anni.
 - Fotofissione tramite acceleratori di elettroni.
 - Reazione $^{100}\text{Mo}(\gamma,n)^{99}\text{Mo}$ fotonucleare tramite acceleratori di elettroni.

- Lungo termine: con un orizzonte temporale di circa 25 anni.
 - Fissione tramite sorgenti intense di spallazione.
 - Reazione $^{100}\text{Mo}(n,2n)^{99}\text{Mo}$.

Attualmente l'Italia dispone di oltre duecentocinquanta centri di medicina nucleare distribuiti su tutto il territorio nazionale (gli attuali strumenti tecnologici vanno dai ciclotroni per la produzione di radioisotopi alle gamma camere, alle SPECT¹, alle nuove PET²).

È importante sottolineare che chi opera con radioisotopi in campo medico deve rispettare importanti vincoli normativi a valenza sopranazionale e nazionale, per essere anche in grado di far fronte ad eventuali emergenze nucleari. A differenza dei produttori di farmaci tradizionali, i

produttori di radiofarmaci sono pochi nel mondo a causa del fatto che gli impianti di produzione richiedono investimenti altissimi, in termini sia economici sia di infrastrutture e risorse umane specializzate. Inoltre, trattandosi di sostanze radioattive il loro trasporto deve rispettare normative nazionali ed internazionali molto stringenti.

Si sottolinea che la logistica nella medicina nucleare ha un peso di oltre il 40% (7% nel caso di una casa farmaceutica per la distribuzione di farmaci tradizionali) sul costo complessivo poiché per lo sfruttamento più equilibrato del tracciante e per le problematiche legate alla gestione del radiofarmaco e delle responsabilità operative si richiede particolare cura nella definizione delle modalità di distribuzione. Secondo il “Libro Bianco” dell’Associazione Italiana di Medicina Nucleare ed *Imaging* Molecolare (AIMN) [1] nell’area del Centro Italia risultano censite 85 strutture di medicina nucleare pari a circa il 33% del totale nazionale, per una popolazione residente superiore di poco a 14 milioni di abitanti (dati ISTAT relativi al 31.12.2005). In particolare la Regione Lazio conta su circa 45 Centri di medicina nucleare, distribuiti principalmente vicino Roma e, in numero ridotto, negli altri capoluoghi di provincia.

Inoltre il mercato dei prodotti per la medicina nucleare si aggira intorno ai 37 milioni di euro e il mercato dei mezzi di contrasto per la radiologia ha un valore di circa 100 milioni di euro.

Sfortunatamente, a causa dei due eventi concomitanti, la prevista chiusura nel 2018 del reattore nucleare canadese *National Research Universal Reactor* (NRU) - Chalk River, Ontario e l’arresto dell’iter au-

torizzativo del reattore canadese *Maples-1* che avrebbe dovuto sopperire alla mancata produzione dell’NRU, si sta verificando una forte carenza a livello mondiale di ^{99m}Tc [2]. L’NRU copriva, mediante fissione nucleare, il 40% del fabbisogno mondiale di ^{99m}Tc ed il 60% degli Stati Uniti, mentre il *Maples-1* non è stato autorizzato per problemi di sicurezza

per questo motivo, il ‘dispositivo di irraggiamento’ proposto nel presente lavoro è l’impianto TRIGA RC-1 del Centro Ricerche Casaccia dell’E-NEA.

Il reattore nucleare di ricerca TRIGA RC-1 [3] (*Training Research Isotopes General Atomics* - Reattore Casaccia 1) è una sorgente di neutroni termici. TRIGA RC-1 (Figura 1) è



Fig. 1 Il reattore TRIGA RC-1

dell’impianto. Già da qualche anno si è manifestata la necessità di utilizzare gli impianti nazionali, anche di ricerca caratterizzati da minori flussi neutronici, al fine di sopperire alla carenza del suddetto radiofarmaco attraverso forniture locali da produzione per attivazione neutronica, anche se tale metodo risulta avere attività specifiche più contenute rispetto alla fissione nucleare.

Le valutazioni relative all’attivazione del ^{98}Mo nei reattori di ricerca, appaiono fra le migliori fra le tecnologie disponibili nel breve periodo: anche

stato costruito nel 1960 nella sua prima versione a 100 kW di potenza nell’ambito dell’iniziativa USA *Atoms for Peace* e successivamente, nel 1967, è stato portato alla potenza di 1 MW su progetto ENEA.

Il nocciolo del reattore consiste in una struttura anulare immersa in acqua, che ha la funzione di refrigerante primario. Gli elementi di combustibile del nocciolo sono geometricamente disposti su sette cilindri coassiali.

In Tabella 1 sono riportate le principali caratteristiche del nocciolo.



Nocciolo	Diametro	535 mm
	Altezza	670 mm
Elementi	Composizione	Lega uranio-ZrH (8,5% in peso U)
	Arricchimento	20% ²³⁵ U
	Moderatore	H ₂ O, ZrH
	Refrigerante	Acqua demineralizzata in convezione naturale
Barre di controllo	Tipologia	3 barre di sicurezza (B ₄ C con follower di combustibile) 1 barra di regolazione (B ₄ C)
Riflettore	Diametro interno	543 mm
	Diametro esterno	1098 mm
	Altezza complessiva	733 mm
	Spessore radiale	214 mm
	Materiale	Grafite

Tab. 1 Caratteristiche del nocciolo del reattore TRIGA RC-1

Sulla base delle caratteristiche neutroniche del reattore TRIGA RC-1, tenendo conto anche di recenti studi [4] [5] relativi ad impianti simili, è stata effettuata una valutazione teorica delle potenzialità di produzione ipotizzando l'irraggiamento di un target di molibdeno metallico arricchito al 98,4% in ⁹⁸Mo nel canale centrale del nocciolo: le concentrazioni di attività ottenibili in modalità di irraggiamento continua (120 ore consecutive) e discontinua (6 ore al giorno 5 giorni a settimana) sono risultate pari rispettivamente a 30 GBq/g e 9 GBq/g [6]. Tali valori sono stati confermati dalle prime risultanze sperimentali scalando i risultati ottenuti su campioni reali con tempi di irraggiamento minori e utilizzando molibdeno in composizione isotopica naturale. Non appena saranno disponibili target di molibdeno metallico arricchito in ⁹⁸Mo, i test saranno replicati.

Da un'analisi preliminare dei possibili percorsi da intraprendere per la produzione di ^{99m}Tc sono stati indivi-

duati quattro scenari a seconda delle modalità di irraggiamento (discontinuo o continuo) e del prodotto da fornire sul mercato (fornitura diretta del molibdeno irraggiato o trattamento dei target irraggiati e conseguente preparazione dei generatori di ^{99m}Tc):

- Scenario A: Irraggiamenti discontinui (6 ore al giorno per 5 giorni a settimana) e fornitura del target irraggiato contenente ⁹⁹Mo;
- Scenario B: Irraggiamenti in continuo (120 ore a settimana) e fornitura del target irraggiato contenente ⁹⁹Mo;
- Scenario C: Irraggiamenti discontinui (6 ore al giorno per 5 giorni a settimana) e fornitura generatori di ^{99m}Tc;
- Scenario D: Irraggiamenti in continuo (120 ore a settimana) e fornitura generatori di ^{99m}Tc.

L'Agenzia ENEA, tramite le proprie competenze tecniche e operative, è potenzialmente in grado di gestire

tutte le fasi del processo, dall'irraggiamento del molibdeno metallico alla preparazione del generatore, anche se sarebbero necessari interventi per adeguare i propri laboratori in modo da soddisfare gli standard *Good Manufacturing Practices* (GMP).

La fornitura ai centri di medicina nucleare del ^{99m}Tc avviene mediante dispositivi denominati 'generatori' (tipicamente contenenti alla consegna 20 GBq in ⁹⁹Mo) dai quali viene estratta la soluzione di tecnezio per la preparazione delle dosi da somministrare ai pazienti. La preparazione di un generatore prevede che, al termine dell'irraggiamento, il target venga sottoposto ad una serie di processi chimico-fisici che lo trasformano in soluzione compatibile con la fisiologia umana: tale soluzione deve poi essere sottoposta a tutti i controlli necessari a garantire un tenore di impurezza entro i limiti consentiti dalla legge.

L'insieme di queste operazioni deve essere effettuato all'interno

di una cosiddetta *Clean Room* (Camera Bianca, cioè un ambiente ad atmosfera controllata in termini di pressione e di inquinamento particellare) che rispetti gli standard GMP richiesti a chi produce radiofarmaci.

Data l'importanza dell'argomento e la necessità del Sistema Paese nei confronti di un prodotto che rischia di diventare estremamente costoso nel prossimo futuro, ognuno degli scenari di produzione proposti, anche quello che prevede

una produzione minimale di ^{99}Mo , avrebbe un notevole impatto sul settore, proponendo anche l'Agenzia ENEA come uno degli attori in prima linea nel tentare di risolvere una criticità dei centri di medicina nucleare italiani.

¹ SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography

² PET: Positron Emission Tomograph

Bibliografia

1. L. Maffioli, N. Mazzuca, E. Bombardieri (2006), "Il Libro Bianco della Medicina Nucleare in Italia", Associazione Italiana di Medicina Nucleare ed Imaging Molecolare, Milano
2. Nuclear Energy Agency, Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD 2010 AEN/NEA: "The Supply of Medical Radioisotopes, Review of Potential Molybdenum-99/Technetium-99m Production Technologies"
3. M. Palomba, M. Carta, L. Falconi, M. G. Iorio, "Activities at TRIGA RC-1 ENEA Research Reactor", IAEA International Conference on Research Reactors: Safe Management and Effective Utilization, Vienna, Austria, 16-20 November 2015, Conference ID: 46533 (CN-231)
4. Artem V. Matyskin, Danas Ridikas, V. S. Skuridin, Johannes Sterba, Georg Steinhauser, (2012), "Feasibility study for production of ^{99m}Tc by neutron irradiation of MoO₃ in a 250 kW TRIGA Mark II reactor", *Journal of Radioanalytical Nuclear Chemistry* (0236-5731)
5. A. I. Ryabchikov, V. S. Skuridin, E. V. Nesterov, E. V. Chibisov, V. M. Golovkov, (2004), "Obtaining molybdenum-99 in the IRT-T research reactor using resonance neutrons", *Nuclear instruments and Methods in Physics research B213*
6. O. Aronica, A. Dodaro, G. Giorgjantoni, M. Olivetti, F. Pisacane, (2016), "Produzione di ^{99m}Tc nel reattore TRIGA RC-1 ENEA Casaccia - Studio di fattibilità", Id. Doc. FSN FISS (16) 03, ENEA

Rete capillare, cancro e legge di Kleiber

Lo studio dell'evoluzione dei complessi biologici ha beneficiato dell'utilizzo di leggi di scala che coinvolgono relazioni tra massa e fabbisogno energetico. L'uso congiunto di modelli, quali le leggi di Kleiber e di Murray, ha aperto nuove possibilità per l'analisi quantitativa della crescita delle masse cancerose, della relativa vascolarizzazione ed evoluzione metastatica. In questo articolo si descrivono i risultati essenziali delle ricerche in tali campi e si esaminano come tali studi possano avere un impatto efficace sulla pratica clinica

DOI 10.12910/EAI2017-051

di **Giuseppe Dattoli, Emanuele Di Palma, Silvia Licciardi e Simonetta Pagnutti, ENEA**

Lo sviluppo delle masse tumorali è stato descritto tramite tecniche matematiche del tutto analoghe a quelle relative alla crescita dei complessi biologici 'ordinari'. Gli studi in tale direzione sono stati originati dall'utilizzo della legge di Kleiber, che stabilisce una relazione tra la massa di un organismo vivente e il relativo metabolismo basale. In questo ambito West, Brown ed Enquist hanno dedotto un modello quantitativo in grado di predire i tempi di crescita, e le necessità energetiche del sistema biologico durante le sue fasi di crescita [1]. I risultati ottenuti con-

fermano il punto di vista di Von Bertalanffy, secondo cui l'evoluzione di tali sistemi è caratterizzata da un periodo di latenza, una crescita di tipo esponenziale ed infine da un meccanismo di saturazione, dovuto ad una sorta di compromesso tra le necessità metaboliche dell'organismo biologico e la disponibilità energetiche dell'ambiente circostante (la cosiddetta *carrying capacity*), che determina anche la massa finale dell'organismo stesso. Evidentemente meccanismi di tale tipo non sono estranei alla crescita delle masse cancerose, che risultano essere un complesso biologico, la cui evoluzio-

ne rispetta i paradigmi di cui sopra. In ambito ENEA è stata avviata, da circa un decennio, una linea di studio che ha coinvolto ricercatori dell'Agenzia, dell'Università di Torino e dell'*Harvard medical school* [2]. I risultati dello studio hanno forn-





to un punto di vista energetico allo sviluppo delle masse tumorali ed alla relativa interazione con l'organo ospitante. Inoltre l'evoluzione metastatica è stata interpretata anche come un processo associato ad una sorta di crisi energetica del tumore stesso. Lo studio ha inoltre evidenziato che la relativa disseminazione metastatica può avvenire prima che il tumore primario divenga clinicamente rilevabile, risultati confermati in ref. [3], in cui si è inoltre evidenziato come comportamenti neoplastici aggressivi possano essere influenzati da fattori metabolici sistemici, associati, ad esempio, alla obesità.

La rete vascolare promossa dalla massa tumorale è il sistema con cui il cancro interagisce con il sistema ospitante, ricevendone benefici dal punto di vista nutrizionale e costituendo una via di fuga per l'eventuale disseminazione di metastasi, quando si presenta una crisi energetica o come conveniente strategia per

una sopravvivenza a lungo termine. È generalmente accettata l'opinione che il tumore abbia un'origine monoclonale e che attraversi una fase di latenza durante la quale le cellule mutate si aggregano assumendo nutrienti dall'esterno, senza aver sviluppato una autonoma architettura di vasi capillari. In questa fase il tumore fluttua intorno ad una dimensione critica che non supera dimensioni clinicamente rilevabili; allo stato attuale delle conoscenze non esiste alcuna indicazione se tale fase avascolare possa durare in maniera indefinita, risulta sperimentalmente evidente che quando il tumore è assistito da un sistema di vasi sviluppato ad hoc si innesca un meccanismo di crescita esponenziale.

Un tumore, nella fase cosiddetta silente, ha un raggio inferiore al millimetro (ovvero al di sotto della rivelabilità diagnostica) e un numero di cellule non superiore a 10.000, la gestione metabolica di tale sistema richiede una potenza all'incir-

ca di $2 \cdot 10^{-7}$ W (ovvero un miliardo di volte minore di quella relativa al metabolismo basale dell'intero organismo) [2]. Tale apporto di potenza è sufficiente alla rigenerazione delle cellule eliminate per ipossia. Per quanto concerne un tumore avascolare, ai limiti della rilevabilità, si possono utilizzare come valori di riferimento $14 \mu W$. Un tale apporto energetico potrebbe essere garantito da un flusso di sangue pari all'incirca a $3,5 \text{ nl/s} \approx 3,5 \mu\text{g/s}$. È dunque evidente che la transizione verso uno stato conclamato necessita di un sistema di distribuzione energetica più articolata di un semplice aggregato cellulare che assuma nutrienti dall'esterno per via osmotica.

La formazione di una rete autonoma trasforma il tumore da un insieme di cellule anomale in un agente aggressivo e potenzialmente letale, poiché presiede alla crescita del tumore e alla diffusione delle metastasi.

Nella Figura 1 sono riportate le fasi di evoluzione del tumore dalla fase

dormiente a quella di crescita. Le fasi di evoluzione sono caratterizzate dall'azione di un segnale detto di VEGF (*vascular endothelial growth factor*) che promuove la formazione di nuovi vasi sanguigni intorno al tumore.

La formazione di una rete capillare complessa apre ulteriori scenari evolutivi (Figura 2): aggregati di cellule cancerose penetrano nel sistema linfatico o nei vasi ematici, si muovono lungo il flusso sanguigno, invadono e si sviluppano in altri tessuti del corpo.

Poiché la maggior parte dei malati di cancro muore dopo che le metastasi si diffondono in altre parti del corpo, è di fondamentale interesse comprendere i meccanismi che regolano la vascolarizzazione e la diffusione delle cellule tumorali attraverso la rete da lui stesso creata.

Dopo questi cenni introduttivi possiamo discutere con maggiore dettaglio come lo studio di tali problematiche possano beneficiare dalla collaborazione di diverse discipline, che includano non solo quelle strettamente medico-biologiche ma anche quelle evolutive, fisico-matematiche, ecologiche e demografiche.

Cancro, ecologia, evoluzione, modelli

Lo scopo dello sviluppo di modelli [4] per lo studio del cancro non è semplicemente quello di riprodurre i dati relativi alla crescita del numero di cellule tumorali, ma anche definire i meccanismi inibitori del cancro stesso e come e perché le cellule cancerose diventino resistenti alle cure stesse. Il senso finale di tali ricerche dovrebbe essere, dunque, quello di coadiuvare una strategia clinica. Il cancro stesso ha una strategia di sopravvivenza non dissimile dalla

selezione darwiniana, che può essere sintetizzata come segue: inganna il sistema immunitario, si mescola in modo inestricabile al tessuto sano, è in grado di muoversi in cerca di territori più fertili, ma alla fine si suicida uccidendo il corpo che lo ospita. Un punto di vista estremo, e cionondimeno affascinante, proposto in anni recenti [5] vede il cancro come una sorta di 'atavismo'¹ che si manifesta quando un qualche meccanismo intervenga a modificare i processi che hanno reso silenti alcuni geni

come è successo in habitat limitati da parte degli esseri umani, le risorse ambientali fino al punto di non ritorno. L'analogia ha senso, così come il fatto che le cellule mutanti sviluppino un fattore di resistenza agli agenti terapeutici, come è già successo per gli antibiotici.

Abbiamo dunque fatto un passo ulteriore adottando un punto di vista ecologico, alla diffusione di un organismo vivente (il tumore) in un altro. Esaminiamo il primo punto ovvero la crescita della massa e l'approvvi-

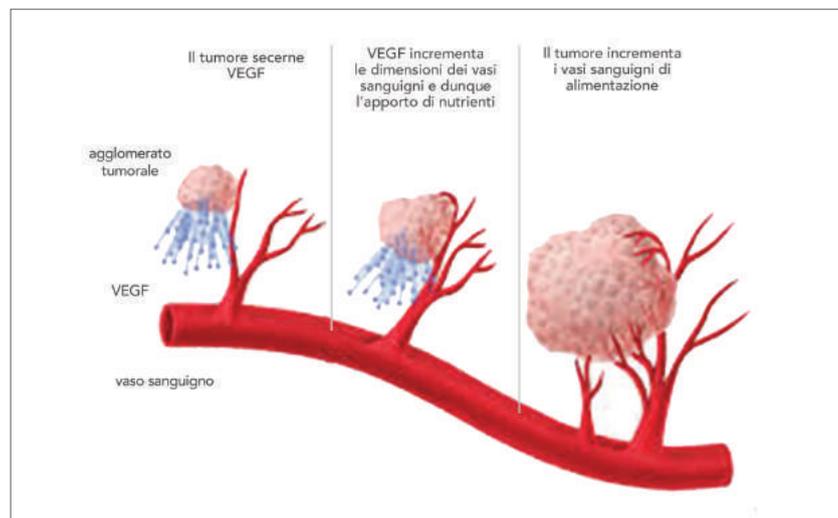


Fig. 1 Formazione di vasi sanguigni stimolata da segnali angiogenici indotti da cellule in stato di ipossia
Fonte: "LUNgevity Foundation", rielaborata dagli autori

ancestrali. L'ipotesi poggia sull'osservazione che il tumore riguardi sia animali che piante e che possa essere rintracciato in possibili meccanismi associati all'origine comune, quando fosse necessaria l'attivazione di processi in grado di generare colonie di cellule.

Rimanendo su un terreno meno speculativo, facciamo notare che il tumore agisce come un colonizzatore di fronte a pascoli (apparentemente) sterminati ed è portato a sfruttare,

gionamento energetico. L'equazione WBE fornisce una dipendenza temporale della massa, data da una relazione del tipo [2]

Equazione 1

$$M_{\infty} \left[1 - \left(1 - \sqrt{\frac{m_0}{M_{\infty}}} \right) e^{-\frac{t}{\tau_1}} \right]^2$$

(1)

in cui la massa finale $M_{\infty} \gg m_0$ e il tempo caratteristico di crescita τ_1 possono essere determinati o da un'in-

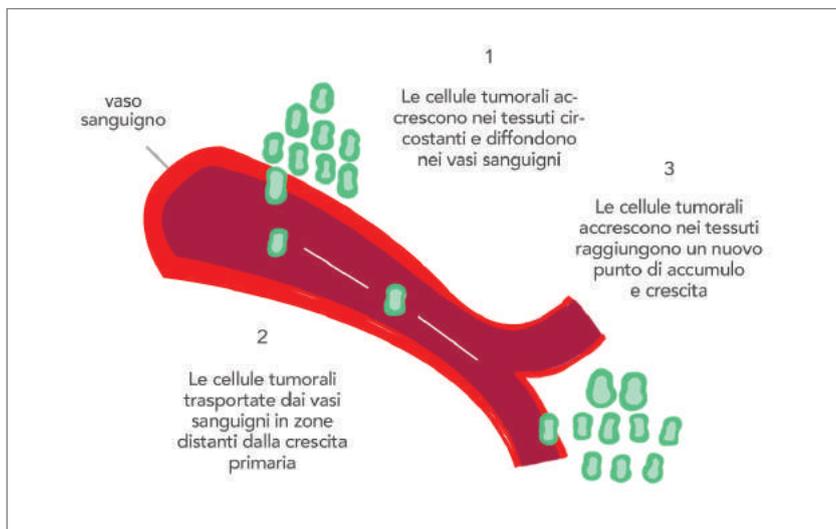


Fig. 2 Migrazione delle cellule tumorali attraverso un vaso capillare
Fonte: immagine tratta da "The national Cancer Institute" e rielaborata dagli autori

terpolazione dei dati sperimentali (quando disponibili) o da considerazioni generali. Il tempo di crescita corrisponde al tempo in cui la massa ha raggiunto il 16% di quella finale. La determinazione della evoluzione delle masse tumorali viene altrettanto ben riprodotta da una curva di Gompertz [2]

Equazione 2

$$m(t) = M_{\infty} e^{k e^{-\frac{t}{\tau}}}, k = \ln\left(\frac{m_0}{M_{\infty}}\right)$$

(2)
o la funzione di Verhust (logistic) [2]

Equazione 3

$$m(t) = m_0 \frac{A(t)}{1 + \frac{m_0}{M_{\infty}} (A(t) - 1)},$$

(3)
in cui $A(t)$ di solito è una funzione esponenziale, ma in generale può essere qualsiasi purché non singolare, differenziabile almeno una volta e tale che $A(0)=1, \lim_{t \rightarrow \infty} A(t)=\infty$.
Le predizioni delle equazioni (1)

sono state confrontate con quelle di un codice indipendente [2] costruito in maniera tale che una cellula maligna all'interno di un tumore ha tre possibilità: mitosi, apoptosi e migrazione verso un differente sito.

Ciascuno dei processi segue una legge di tipo esponenziale con un proprio tempo caratteristico e con la restrizione che i processi avvengano in tempi distinti. Il confronto tra i modelli viene fatto in Figura 3 e l'accordo è più che ragionevole, tenuto anche conto che il codice di *benchmarking* è basato su un modello puramente probabilistico, mentre gli altri modelli sono essenzialmente deterministici.

Torniamo ora al problema della vascolarizzazione, promossa, come già detto, da segnali chimici trasmessi dalle cellule maligne (ma non necessariamente solo da quelle) che determina la formazione di nuovi vasi. Questi cominciano a dividersi per irrorare una massa viepiù crescente e la conseguente ramificazione è dinamica ed opportunistica. Per tale ragione la relativa modellazione

è estremamente difficile. Comunque sia e qualsiasi difficoltà si frapponga, ci si aspetta che dopo un certo numero di divisioni i capillari si combinino in modo da assicurare (almeno nelle fasi iniziali) la stessa quantità di nutrienti alle cellule costituenti ciascuna parte del tumore.

Durante le fasi iniziali il numero di capillari e la massa evolvono in maniera simile, con gli stessi tempi caratteristici. Quando il tumore cresce oltre una certa soglia avvengono nuovi fenomeni. Si ha, in particolare, la formazione di una zona necrotica nella parte interna del tumore stesso, perché non raggiunta da sufficiente flusso sanguigno. Una spiegazione piuttosto semplice è la seguente: il tumore si estende verso l'esterno per infiltrare i tessuti sani, i vasi tendono a diramarsi verso l'interno. Ad ogni diramazione corrisponde una diminuzione del raggio del vaso, pertanto la relativa pressione idraulica aumenta così come il dispendio energetico associato al trasporto di nutrienti. Al crescere della massa questi fattori contribuiscono ad una distribuzione non omogenea dei nutrienti e alla formazione di zone necrotiche (di solito al centro del tumore) dovute ad ipossia.

Modelli e pratica clinica

Le considerazioni sviluppate nei paragrafi precedenti offrono una lettura, sicuramente semplicistica, ma efficace della interazione tra massa tumorale, distribuzione energetica e interazione con l'organismo ospitante.

Onde evitare fraintendimenti ricordiamo che il processo di angiogenesi (o meglio di linfo-angio genesi) è estremamente complesso [6]. Fino ad oggi più di una dozzina di proteine sono state identificate tra i relativi

attivatori. Oltre al già citata VEGF, dovremmo includere in bFGF (*basic Fibroblast Growth factor*), l'angiogenina, il TGF-alfa e beta (*transforming growth Factor*), il TNF (*tumor necrosis factor*) ecc.

Evitando però di appesantire la discussione con nozioni di non stretta pertinenza professionale degli autori, sottolineiamo che il VEGF è un potente agente angiogenico sia per i tessuti neoplastici che per quelli normali. L'ipossia, indotta dalla crescente distanza tra il tumore e vasi sanguigni o da inefficiente irrorazione, provoca l'espressione del VEGF, che a sua volta permette la crescita di cellule di una nuova e più efficace rete di distribuzione che, insieme al sistema linfatico, costituisce il canale di accesso per la trasduzione delle metastasi. Tenuto conto che spesso sono le metastasi e non il tumore primario le cause principali di morte per cancro, una delle possibili ricadute di

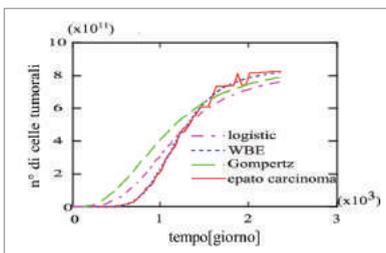


Fig. 3 Confronto tra i dati reali relativi alla crescita di un epato-carcinoma con le curve di crescita dei vari modelli previsionali [2]

una modellazione potrebbe essere lo studio di un sistema di controllo per bloccare le vie di fuga del tumore, indicando quali siano le "rotte di transito" di elezione per ogni tipo di tumore (il cancro al seno ha come organi di crescita metastatica le ossa) o addirittura disporre di mappe per ogni singolo paziente. Il modello potrebbe essere pertanto sfruttato per determinare opportune manipolazioni del sistema immunitario che non solo impediscano la crescita del tumore ma anche,

e soprattutto, la relativa diffusione e impianto in altri organi.

Evidentemente stiamo parlando di un programma estremamente ambizioso, che coinvolge notevoli risorse umane, finanziarie, computazionali e, prima di tutto, la formazione di nuove figure professionali con competenze orizzontali di biologia, fisica, matematica, medicina e calcolo. Non riteniamo si tratti di un'ipotesi irrealistica visto che il cancro è il fenomeno biologico maggiormente studiato e che, durante i decenni (dalla 'dichiarazione di guerra al cancro' del presidente Nixon nel 1969), non si è giunti (a parte alcuni tipi di tumore quali le leucemie e in particolare quelle infantili) a un significativo progresso in termini di comprensione dell'origine del tumore stesso, della relativa prevenzione e della cura.

Per saperne di più:
giuseppe.dattoli@enea.it

¹ Il termine atavismo, riferito alla genetica, indica che il DNA è una sorta di archivio in cui viene conservata tutta la storia evolutiva di un individuo. I geni che esprimono un certo carattere (come coda o piedi palmati negli umani) non sono assenti ma soppressi e riappaiono per ragioni genericamente attribuibili a malfunzionamento. Non è escluso che si tratti di un meccanismo evolutivo in base al quale vengono riattivati se se ne presenta la necessità.

BIBLIOGRAFIA

1. V.M. Savage, A.B. Herman, G.B. West, and K. Leu, Using fractal geometry and universal growth curves as diagnostics for comparing tumor vasculature and metabolic rate with healthy tissue and for predicting response to drug therapy, *Discrete and Continuous Dynamical Systems, Series B (DCDS-B)*, Vol. 18(14), 1077-1108 (2013)
2. G. Dattoli, C. Guiot, P.L. Ottaviani, S. Pagnutti, P.P. Del Santo and T. Deisboch, Cancer metabolism and the dynamics of the metastasis, *J. Theor. Biology* 256, 305-310, (2009)
G. Dattoli, E. Di Palma, S. Licciardi, C. Guiot, T.S. Deisboeck, *Capillary Network, Cancer and Kleiber Law*, arXiv:1403.4443 [physics.bio-ph] (2014)
3. H. Li, M. J. Stampfer, L. Mucci, N. Rifai, W. Qiu, T. Kurth, J. Ma, A 25-Year Prospective Study of Plasma Adiponectin and Leptin Concentrations and Prostate Cancer Risk and Survival, *Clinical Chemistry* 56,1 (2010)
4. J.G. Scott, P. Gerlee, D. Basanta, A.G. Fletcher, P.K. Maini and A. RA Anderson, *Mathematical modeling of the metastatic process*, arXiv:1305.4622v2 [q-bio.TO] 21 May 2013
5. Z. Meraly, *Physicists' model proposes evolutionary role for cancer*, *Nature* doi:10.1038/nature.2014.16068
6. N. Nishida, H. Yano, T. Nishida, T. Kamura, M. Kojiro, *Angiogenesis in Cancer*, *Vascular Health and Risk Management* 2, 213-219 (2006)

Rivelatori di radiazione a stato solido luminescenti: la sfida della dosimetria in radioterapia

R&S di rivelatori di radiazione innovativi basati sulla fotoluminescenza di centri di colore nel fluoruro di litio per applicazioni dosimetriche in radioterapia oncologica e nella diagnostica di fasci di protoni, combinando fotonica e nanotecnologie

DOI 10.12910/EAI2017-052

di **Rosa Maria Montereali, Francesca Bonfigli, Enrico Nichelatti, Massimo Piccinini e Maria Aurora Vincenti**, ENEA

La radioterapia oncologica è basata sull'uso di radiazioni ionizzanti per colpire e distruggere le masse tumorali, risparmiando, per quanto possibile, i tessuti e gli organi sani adiacenti [1].

I rivelatori di radiazione utilizzati per la misura della dose forniscono un segnale proporzionale alla dose assorbita dal rivelatore stesso, il quale deve essere opportunamente calibrato per fornire il valore di dose assorbita in acqua, equivalente ai tessuti molli che prevalentemente costituiscono il corpo umano.

Rivelatori di radiazione per dosimetria clinica in radioterapia

A fronte di un rapido sviluppo di materiali scintillatori e di tecnologie per rivelatori di radiazione attivi, che consentono misurazioni in tempo reale e necessitano di alimentazione elettrica, in dosimetria clinica sono comunemente utilizzati rivelatori passivi, che accumulano l'informazione per la misura della dose integrata, non necessitano di alimentazione elettrica e vengono letti successivamente all'esposizione. Sebbene siano numerosi i sensori di radiazione e gli approcci per la misu-

ra della dose assorbita, sono ancora aperti la ricerca di materiali e lo sviluppo di metodi e sistemi di lettura più efficienti e versatili, che siano in grado di migliorarne l'accuratezza e, soprattutto, di semplificare le procedure richieste al fisico medico per la loro calibrazione, lettura e archiviazione, consentendo così una migliore sicurezza del trattamento radioterapico nonché la riproducibilità ed il confronto dei risultati clinici [2]. In particolare, non è ancora disponibile un rivelatore che consenta sia la misura assoluta di dose che la sua mappatura bidimensionale, una delle sfide tecnologiche più ambiziose



soprattutto per lo sviluppo di tecniche di adroterapia mirate. Molti dei rivelatori di radiazione utilizzati per misure dosimetriche in radioterapia sono a stato solido, la cui elevata densità di ionizzazione consente una riduzione del loro volume. In dosimetria clinica, numerosi sono quelli basati sulla risposta ottica di difetti elettronici puntiformi indotti da radiazioni in materiali

isolanti, sia inorganici sia organici, e in particolare quelli basati sulla loro emissione di luce, o luminescenza, fenomeno ampiamente utilizzato anche per lo sviluppo di sorgenti di luce e laser [3]. Recentemente, all'ENEA sono state avviate attività di R&S su rivelatori di radiazione innovativi basati sulla fotoluminescenza (PL, *PhotoLuminescence*) di centri di colore in cristalli

di fluoruro di litio (LiF) per dosimetria clinica in radioterapia [4]. L'elevatissima risoluzione spaziale intrinseca su un ampio campo di vista e la versatilità offerta dalla crescita mediante evaporazione termica di film sottili di LiF [3] consentono applicazioni anche alla diagnostica avanzata di fasci di protoni, con promettenti risultati per la dosimetria ad alte dosi con mappatura bidimensionale della



Fig. 1a Polveri e pastiglie di LiF di varie forme, dimensioni e drogaggio utilizzate per dosimetri termoluminescenti

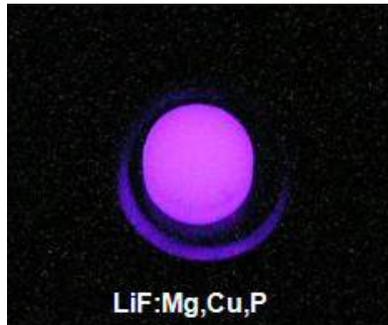


Fig. 1b Emissione di TL (- 380 nm) da un rivelatore LiF-TLD serie GR200, drogato con Mg, Cu e P

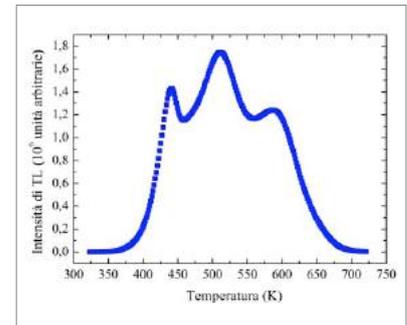


Fig. 1c Curva del segnale di TL in funzione della temperatura per un cristallo di LiF colorato con raggi gamma, dose 3×10^5 Gy

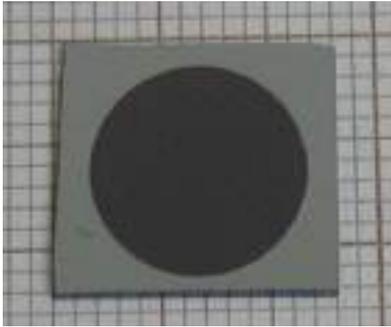


Fig. 2a Film sottile di LiF otticamente trasparente, cresciuto per evaporazione termica su substrato di Si presso il Laboratorio Micro e Nanostrutture per la Fotonica del Centro Ricerche ENEA di Frascati

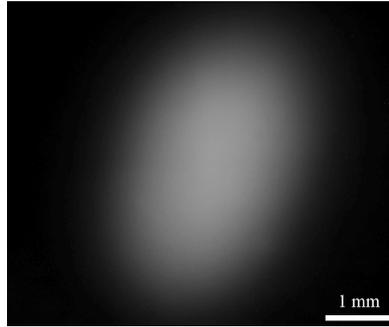


Fig. 2b Immagine in fotoluminescenza, registrata da un film di LiF cresciuto su substrato di vetro, della sezione trasversale del fascio di protoni da 3 MeV, dose media $7,4 \times 10^5$ Gy, prodotto dall'acceleratore lineare TOP-IMPLART

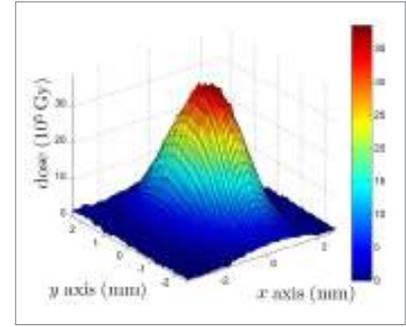


Fig. 2c Distribuzione spaziale della dose rilasciata nel film di LiF dal fascio di protoni, elaborando l'immagine di Fig. 2b

dose [5]. Evidenzieremo alcune peculiarità, vantaggi e limiti di questo nuovo approccio per applicazioni in radioterapia, con particolare riferimento all'adroterapia, l'ultima frontiera nella sfida contro il cancro [1].

Dosimetria clinica: alcune considerazioni

Quando le radiazioni ionizzanti penetrano nei tessuti, vi depositano energia attraverso processi di eccitazione e di ionizzazione, che provocano modificazioni chimiche, fisiche e biologiche.

Le dosi tipiche utilizzate in trattamenti clinici di radioterapia coprono l'intervallo fino a 20 Gy. Ad esempio, 40 irraggiamenti da 2 Gy (tumore alla prostata), 20 da 2,5 Gy (tumore alla mammella), 4 da 12 Gy (cancro al polmone), irraggiamenti da 8 Gy per il trattamento palliativo di metastasi da tumore osseo. A parità di dose, l'effetto biologico dipende non solo dal tipo di tessuto, ma anche dal tipo di radiazioni ionizzanti. Fotoni di elevata energia, quali raggi X e gamma, e particelle cariche, quali elettroni, protoni e ioni leggeri, sono caratterizzati da una grandezza fisica, il LET (*Linear Energy Transfer*),

definito come l'energia persa dalla radiazione nell'attraversare l'unità di lunghezza. I protoni e altre particelle adroniche hanno un LET elevato, che dipende sia dalla loro energia sia dalla loro massa. L'adroterapia, cioè la terapia che utilizza queste particelle, costituisce la forma più avanzata di radioterapia esterna; la ricerca di rivelatori e protocolli per la dosimetria di queste radiazioni risulta ancora aperta.

Luminescenza e dosimetria

La luminescenza è un fenomeno che presentano alcune sostanze capaci di emettere, sotto forma di radiazione elettromagnetica, o luce, parte dell'energia assorbita precedentemente in varie forme [3]. Tra i materiali isolanti, il LiF in forma pura e drogata è conosciuto da oltre 60 anni ed utilizzato con successo come dosimetro clinico basato sulla termoluminescenza (TL, *ThermoLuminescence*). Pellet di LiF drogato con specifiche impurezze (Mg, Cu, P) sono mostrati in Figura 1a. Il processo di lettura della dose sfrutta la luminescenza indotta dal riscaldamento del dosimetro fino ad alcune centinaia di gradi centigradi (Figura 1b,c).

Anche la fotoluminescenza visibile di centri di colore indotti da radiazione in cristalli di LiF [3] è stata proposta e studiata per questo scopo già negli anni 70. Tra le peculiarità del LiF, significativa per la dosimetria clinica è la buona equivalenza con il tessuto umano (*tissue equivalence*) esplicitata dal numero atomico efficace, Z_{eff} , che caratterizza la risposta di un composto alle radiazioni ionizzanti. Lo Z_{eff} del LiF è pari a 8,3, molto vicino al valore ideale di 7,5 corrispondente all'acqua, della quale il corpo umano è composto per oltre il 70%. A tutt'oggi, l'uso del LiF in dosimetri commerciali basati sulla fotoluminescenza visibile dei suddetti centri è limitato a dosi superiori a 50 Gy, utilizzando film opachi spessi qualche millimetro, costituiti sostanzialmente da strati di polveri pressate e incapsulate in fogli di plastica.

Rivelatori a film sottile di LiF a lettura di fotoluminescenza per diagnostica di fasci di protoni

Recentemente, l'uso di rivelatori innovativi a film sottile di LiF basati sulla lettura di fotoluminescenza è stato sperimentato con successo per



la diagnostica avanzata di fasci di protoni di bassa energia [5], prodotti dall'acceleratore lineare TOP-IMPART, in sviluppo presso l'ENEA C.R. Frascati per applicazioni di protonterapia [6]. È interessante notare che la profondità di penetrazione di tali protoni è superiore allo spessore di $\sim 1 \mu\text{m}$ dei film utilizzati, e che il segnale di fotoluminescenza integrato presenta un andamento lineare in funzione della dose nell'intervallo 10^3 - 10^6 Gy [5]. Inoltre, la risposta ottica è indipendente dall'energia dei protoni, caratteristica non comune per i dosimetri a stato solido irraggiati con particelle. La Figura

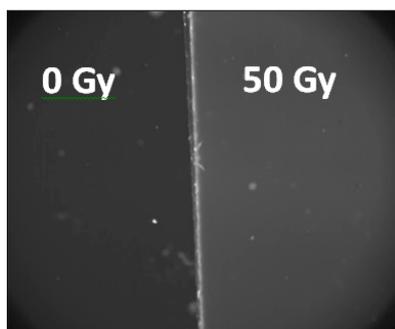


Fig. 3a Immagine ottenuta al microscopio in fluorescenza di un cristallo di LiF non irraggiato – sinistra – e di un cristallo irraggiato a 50 Gy con raggi-X clinici da 6 MV – destra

2a mostra un film di LiF depositato su substrato riflettente di Si. I film di LiF cresciuti per evaporazione termica in condizioni controllate, essendo trasparenti e caratterizzati da un'elevata dinamica della risposta di fotoluminescenza in funzione della dose, consentono di ottenere immagini bidimensionali con risoluzione spaziale sub-micrometrica della distribuzione trasversale d'intensità del fascio. Questo è possibile esponendo i film di LiF in aria perpendicolarmente al fascio di protoni

e acquisendo successivamente l'immagine dell'area irraggiata tramite un microscopio ottico convenzionale in fluorescenza (Figura 2b). Il segnale di fotoluminescenza è localmente proporzionale alla dose assorbita, in modo non lineare per dosi superiori a $\sim 10^6$ Gy: misurando indipendentemente la dose integrata e calibrando l'andamento del segnale di fotoluminescenza in funzione della dose, è possibile ricostruire la sua distribuzione bidimensionale, come mostrato in Figura 2c per un film di LiF cresciuto su vetro. Sebbene la sensibilità non sia adeguata alla misura di dosi cliniche, i risultati sono estrema-

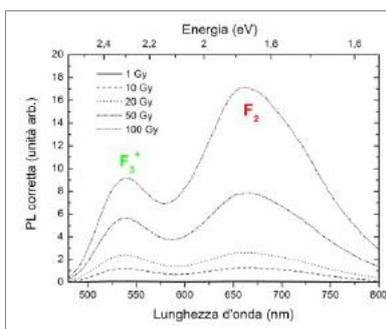


Fig. 3b Spettri di fotoluminescenza di cristalli di LiF irraggiati a dosi crescenti con raggi-X clinici da 6 MV e misurati a temperatura ambiente sotto eccitazione con un laser continuo a 457,9 nm

mente significativi per la diagnostica e mappatura bidimensionale della dose in fasci di protoni [5].

Fotoluminescenza di centri di colore nel fluoruro di litio per dosimetria clinica

Nello studio del comportamento del LiF irraggiato con diversi tipi di radiazioni e in condizioni differenti, la misura della fotoluminescenza dipende fortemente dalle condizioni sperimentali. Per que-

sto motivo, abbiamo indagato [4] la risposta di cristalli di LiF irraggiati a dosi equivalenti in acqua tra 1 e 100 Gy con i raggi-X da 6 MV prodotti da un acceleratore lineare clinico presso il Tom Baker Cancer Centre, a Calgary, in Canada. Ulteriori test sono stati eseguiti con raggi-X da 5 MV presso l'Azienda Ospedaliera S. Maria di Terni. Il segnale di fotoluminescenza è stato misurato al Centro Ricerche ENEA di Frascati sia con un microscopio ottico in fluorescenza (Figura 3a) che con uno spettrometro da banco, sotto eccitazione laser. Gli spettri ottenuti sono mostrati in Figura

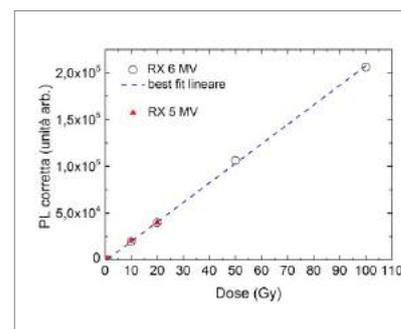


Fig. 3c Segnale di fotoluminescenza spettralmente integrata in funzione della dose e suo fit lineare. Sono riportati anche i valori ottenuti per irraggiamenti clinici a 5 MV

3b; in essi l'intensità cresce linearmente all'aumentare della dose, come confermato dal segnale di fotoluminescenza integrato riportato in Figura 3c. La linearità della risposta costituisce un indubbio vantaggio per un dosimetro clinico, insieme alla stabilità a temperatura ambiente e in normali condizioni di illuminazione, fattori che consentono l'acquisizione del segnale integrato temporalmente e spettralmente, nonché l'eventuale successiva riletta dell'informazione.

Questi incoraggianti risultati sono stati confermati da irraggiamenti eseguiti alla dose di 5 Gy con fasci clinici di protoni tra 60 e 250 MeV presso il CNAO, Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica (Pavia), e risultano confrontabili entro il 3% con l'irraggiamento con radiazione gamma effettuato presso la sorgente primaria di ^{60}Co all'Istituto Nazionale di Metrologia delle Radiazioni Ionizzanti, INMRI-ENEA (Roma).

Futuri sviluppi

Il dosimetro di LiF a lettura di fotoluminescenza si candida per la

diagnostica di fasci di protoni ad alte dosi, mappatura della dose con elevata risoluzione spaziale e dinamica di contrasto, nonché per la dosimetria passiva in radioterapia. La stabilità dei difetti a temperatura ambiente e in condizioni di normale illuminazione consente di maneggiarlo senza particolari precauzioni, semplificando le procedure di calibrazione, esposizione e lettura, con conseguente riduzione dei tempi e maggiore affidabilità, fondamentale quando si parla di salute del paziente. Il ricorso a strutture multistrato a bassa dimensionalità può offrire l'opportunità di migliorare le prestazioni dei dispositivi a

film sottile, combinando fotonica e nanotecnologie.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano per il prezioso contributo i colleghi ENEA Maria Pimpinella e Vanessa De Coste dell'INMRI, Mario Ciocca e Alfredo Mirandola del CNAO di Pavia, Eduardo Bono e Marco Italiani dell'Azienda Ospedaliera S. Maria di Terni, Rao F. Khan e José E. Villarreal-Barajas, del Tom Baker Cancer Center, Calgary (Canada) per le stimolanti discussioni, e Stefano Libera dell'ENEA per il supporto tecnico.

BIBLIOGRAFIA

1. G. Tosi (2017), “La radioterapia oncologica, Fisica e tecnologia alleate contro il cancro”, *Il Nuovo Saggiatore*, 33, 38-52
2. C. P. Karger, O. Jakel, H. Palmans and T. Kanai (2010), “Dosimetry for ion beam radiotherapy”, *Phys. Med. Biol.*, 55, R193-R234
3. R. M. Montereali, F. Bonfigli, E. Nichelatti, M. Piccinini, M. A. Vincenti (2015), “Fotoluminescenza e fotonica: dalle sorgenti di luce miniaturizzate ai rivelatori di radiazione”, rivista ENEA *Energia, Ambiente e Innovazione*, 6, 51-59
4. J. E. Villarreal-Barajas, M. Piccinini, M. A. Vincenti, F. Bonfigli, R. Khan, R. M. Montereali (2015), “Visible photoluminescence of colour centres in LiF crystals for absorbed dose evaluation in clinical dosimetry”, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering*, 80, 012020 1-5
5. M. Piccinini, E. Nichelatti, A. Ampollini, L. Picardi, C. Ronsivalle, F. Bonfigli, S. Libera, M. A. Vincenti and R. M. Montereali (2017), “Proton beam dose-mapping via color centers in LiF thin film detectors by fluorescence microscopy”, *Europhys. Lett.*, 117, 37004 1-5
6. L. Picardi et al. (2017), “Tecnologie e ricadute cliniche di TOP IMPLART, prototipo di impianto per protonterapia”, *in questo numero*

Metodi fisici e biologici per un approccio multiparametrico alla valutazione della dose individuale negli incidenti radiologici

Breve panoramica sui metodi di tipo fisico e biologico che possono essere utilizzati in caso di incidente radiologico per valutare l'esposizione individuale, utile per selezionare le persone più colpite e scegliere la terapia medica più adeguata

DOI 10.12910/EAI2017-053

di **Emanuela Bortolin**, Istituto Superiore di Sanità e **Antonella Testa**, ENEA

L'uso diffuso di sorgenti radioattive e raggi X per scopi medici, industriali, militari e nel settore dell'agricoltura e della produzione alimentare ha aumentato il rischio di sovraesposizione alle radiazioni a seguito di incidenti nei luoghi di lavoro. A questo si è aggiunto, negli ultimi tempi, il rischio di uso malevolo delle radiazioni per scopi terroristici (abbandono di sorgenti in luoghi pubblici, attacco con bombe 'sporche' contenenti materiale radioattivo, attacco a impianti nucleari). Le radiazio-

ni di cui parliamo sono indicate come ionizzanti perché trasportano e rilasciano energia sufficiente a strappare elettroni da atomi e molecole neutri trasformandoli in ioni carichi. Tali processi di ionizzazione sono all'origine di danni consistenti nella struttura del mezzo attraversato dalla radiazione, danni che, nel caso di materiali biologici come cellule o tessuti, possono avere conseguenze anche molto gravi, nell'immediato e a lungo termine, per la salute degli individui colpiti.

Dopo un incidente radiologico la

stima dell'esposizione individuale può rappresentare un valido aiuto per stabilire la gravità della situazione, selezionare le persone più colpite e scegliere la terapia medica più adeguata. I metodi che possono essere utilizzati sono di tipo diverso, biologico o fisico. Si tratta in tutti i casi di procedure di analisi che consentono di valutare il livello di esposizione sulla base della stima dei danni indotti dalla radiazione in materiali di vario tipo, DNA delle cellule del sangue, tessuti biologici o materiali inerti. L'entità del danno radioindotto è,



infatti, proporzionale alla quantità di energia o 'dose' rilasciata dalla radiazione ionizzante nei vari materiali che diventano così dei dosimetri, ossia sistemi in grado di fornire una stima dell'energia assorbita, parametro fondamentale per stabilire la gravità degli effetti sulla salute.

Tecniche di dosimetria fisica

La dosimetria fisica convenzionale include una serie di procedure standardizzate per la valutazione della dose basate sull'applicazione di tecniche fisiche a materiali con caratteristiche strutturali particolari, generalmente realizzati *ad hoc*. Esiste una grande varietà di sistemi dosimetrici impiegati per scopi diversi, dal monitoraggio ambientale, alla verifica dei piani di trattamento in radioterapia, al controllo degli impianti industriali per l'irraggiamento a scopo conservativo degli alimenti o la sterilizzazione di dispositivi/presidi

medici, alla sorveglianza dei lavoratori professionalmente esposti a sorgenti di radiazioni. Tali sistemi, anche se numerosi, non sono, tuttavia, disponibili nel caso di un incidente radiologico che coinvolga civili che, a differenza dei lavoratori professionalmente esposti, sono sprovvisti di dosimetri convenzionali. In questi casi si può ricorrere alla dosimetria fortuita [1] che fa uso di tecniche di tipo fisico applicate ad alcuni tessuti umani, come denti e unghie, o a materiali inerti presenti in oggetti personali come cellulari, carte elettroniche, caramelle, medicinali, sigarette, gioielli ecc. Negli ultimi anni sono stati condotti molti studi su una grande varietà di materiali utilizzando soprattutto le tecniche fisiche basate sulla luminescenza otticamente (*Optically Stimulated Luminescence*, OSL) o termicamente (*Thermoluminescence*, TL) stimolata e sulla risonanza paramagnetica elettronica (*Electron Paramagne-*

tic Resonance, EPR), che rivelano e misurano i difetti radioindotti nella struttura dei solidi. In particolare, risultati incoraggianti sono stati ottenuti recentemente, nel corso del lavoro condotto nell'ambito di progetti europei, con la tecnica OSL applicata ai componenti elettronici (resistori) delle schede dei cellulari e con la tecnica EPR sul vetro dei display degli stessi telefoni cellulari (Figura 1). Con la tecnica EPR è possibile anche misurare il danno radio-indotto in tessuti umani poveri di acqua come denti e unghie. Queste ultime in particolare si prestano bene a situazioni di emergenza per la facilità di prelievo del campione.

Tecniche di dosimetria biologica

La dosimetria biologica, basata sull'analisi di specifiche aberrazioni cromosomiche nei linfociti circolanti di sangue periferico (dosimetria citogenetica), è utilizzata per la valutazione della sovraespo-

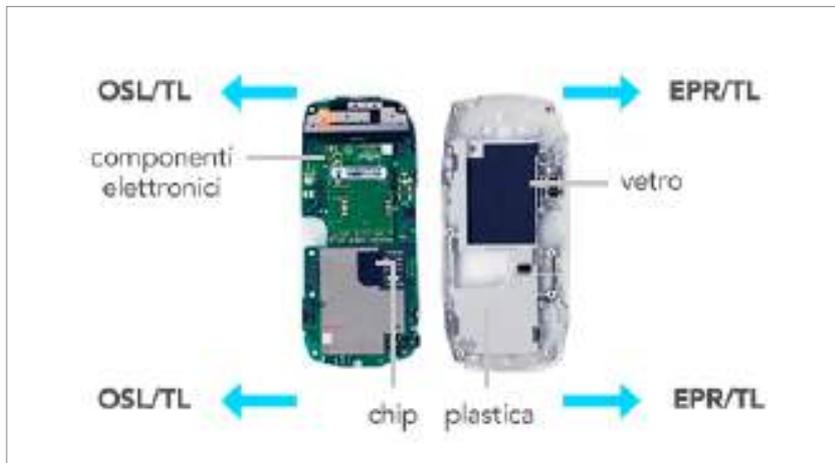


Fig. 1 Materiali provenienti da telefoni cellulari testati come dosimetri fortuiti nel corso di studi condotti in ambito europeo

sizione accidentale alle radiazioni ionizzanti a partire dagli anni 60, in particolare nei casi in cui la dosimetria fisica si riveli incerta o addirittura assente. La tipica aberrazione che rappresenta ancora oggi il *gold standard* della dosimetria biologica è il ‘*cromosoma dicentrico*’ che, insieme all’anello centrico, è specificamente indotto dall’esposizione a radiazioni ioniz-

zanti. Il dicentrico deriva da uno scambio asimmetrico tra due cromosomi non ancora replicati (nella fase G0/G1 del ciclo cellulare), che si trovano ad una determinata distanza, detta *rejoining distance*, stimata essere di circa 1 µm di diametro (Figura 2).

I linfociti di sangue periferico (e precisamente i linfociti T che rappresentano circa il 70% della popo-

lazione linfocitaria) vengono considerati “*dosimetri circolanti*” grazie ad alcune particolarità che li contraddistinguono rispetto ad altri sistemi cellulari. Infatti, essi possiedono un background spontaneo di dicentrici così basso da essere considerato trascurabile, sono caratterizzati da una emivita piuttosto lunga (da 22 settimane a circa 3 anni) ed inoltre sono bloccati nella fase di interfase del ciclo cellulare ma possono essere stimolati a dividersi *in vitro*. Questa ultima caratteristica rende queste cellule in grado di raccogliere e ‘registrare’, passando attraverso ogni distretto corporeo, i danni al DNA causati dall’esposizione a radiazioni, danni che possono essere visualizzati attraverso l’analisi di aberrazioni cromosomiche nelle cellule in metafase. La dose ottenuta dall’analisi dei dicentrici rappresenta la dose media assorbita a corpo intero e la dose minima valutabile per questa tecnica è circa 0,1/0,2 Gy. Il limite principale di questa metodica dipende dal fatto che, essendo i dicentrici aberrazioni instabili, cioè alterazioni morfologiche tali da essere selettivamente eliminate nelle successive divisioni della cellula, la valutazione della dose è considerata attendibile solamente se l’analisi avviene in tempi rapidi rispetto alla esposizione a radiazioni ionizzanti.

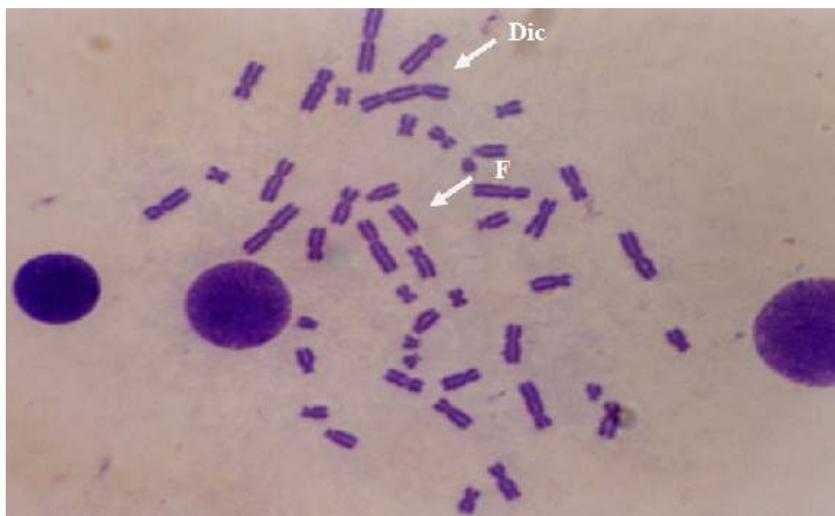


Fig. 2 Cromosoma dicentrico (Dic) e frammento acentrico associato (F)
Fonte: foto ENEA

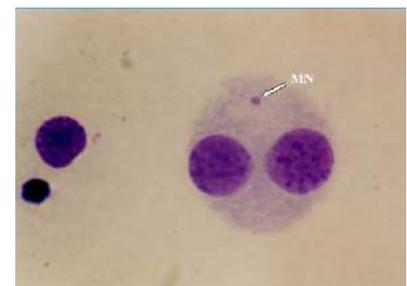


Fig. 3 Linfocita binucleato contenente un micronucleo (MN)
Fonte: foto ENEA



Accanto al saggio dei dicentrici nell'ambito della dosimetria biologica, esistono altre metodiche ampiamente standardizzate come il test dei micronuclei (MN) e le traslocazioni reciproche visualizzate attraverso la tecnica di ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) [2].

Il saggio dei 'micronuclei' nelle cellule linfocitarie binucleate (CBMN), proposto nell'ultimo decennio in dosimetria biologica come test alternativo al saggio dei dicentrici, presenta alcuni vantaggi rispetto a quest'ultimo: è molto più rapido e l'osservazione al microscopio è molto più semplice ma non è specifico per esposizione a radiazioni ionizzanti ed inoltre è influenzato dall'età e dal genere determinando una risoluzione più bassa nella stima di dose ($>0,2/0,3$ Gy) (Figura 3). L'unica tecnica di dosimetria biologica in grado di effettuare una ricostruzione retrospettiva della dose a 'lungo termine', cioè anni o decenni dopo l'avvenuta sovraesposizione, utilizza l'analisi delle *traslocazioni reciproche*, aberrazioni stabili, cioè alterazioni che vengono ereditate inalterate dalle cellule figlie ad ogni divisione cellulare.

La valutazione delle traslocazioni viene effettuata attraverso tecniche di ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) con la quale si possono colorare selettivamente una o più coppie di cromosomi omologhi utilizzando sonde di DNA per interi cromosomi (sonde *paint*) marcate con diversi fluorocromi (Figura 4).

Con questa metodica, la dose che viene calcolata si riferisce alla dose media al midollo osseo attivo corrispondente al tessuto staminale precursore dei linfociti circolanti.

Questa tecnica, oltre che essere molto costosa, ha un limite determinato dalla porzione del genoma che vie-

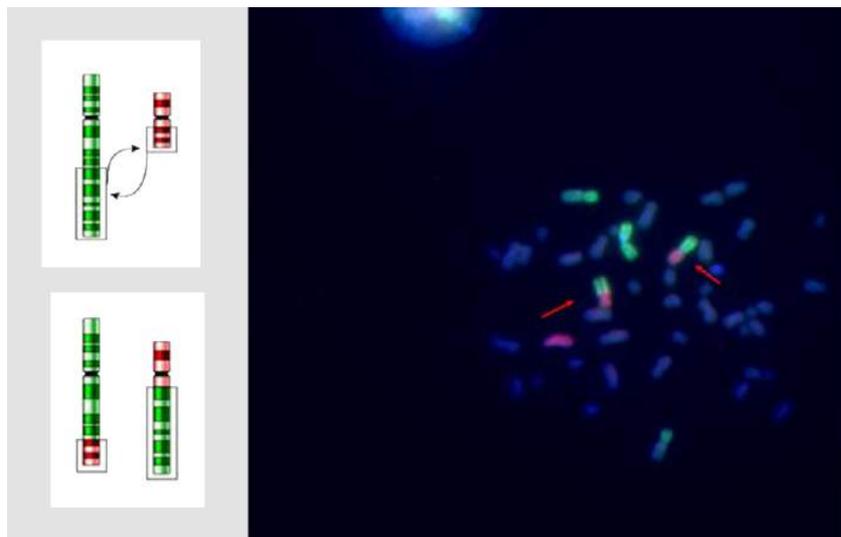


Fig. 4 Traslocazione reciproca in linfocita umano; ibridazione *in situ* con sonde fluorescenti per i cromosomi 1, 2 (verde) e 4 (rosso)

Fonte: foto ENEA

ne evidenziato, cioè dal numero dei cromosomi che vengono ibridati e da quanti differenti fluorocromi vengono impiegati.

Oltre a queste, diverse nuove tecniche sono state recentemente introdotte e sono in corso di validazione come ad esempio: la condensazione prematura dei cromosomi (PCC), i foci H2AX e l'analisi dell'espressione di specifici geni.

Approccio multiparametrico: reti europee e internazionali

Nella valutazione retrospettiva della dose assorbita è importante poter disporre di diversi sistemi dosimetrici perché ciascuno di essi, usato singolarmente, presenta limiti e vantaggi legati a parametri come la sensibilità alle radiazioni, la stabilità del danno indotto, la dipendenza dalle caratteristiche del singolo individuo come il genere o l'età nel caso di matrici biologiche, l'esposizione alla luce per gli oggetti personali e così via. Al contrario, un

approccio multiparametrico, che prenda in considerazione e confronti i dati provenienti da sistemi dosimetrici diversi, consente, in linea di principio, di avere una stima più accurata dell'esposizione anche attraverso l'acquisizione di una serie di informazioni complementari, quali ad esempio la geometria dell'irraggiamento (a corpo intero o parziale) o il tempo trascorso dall'esposizione, che possono essere ricavate proprio dal confronto dei risultati ottenuti con metodi diversi. Un approccio di questo tipo è quello che è stato proposto attraverso i progetti europei *MULTIBIODOSE* (*MULTI-disciplinary BIODOSimetric tools to manage high scale radiological casualties*, www.multibiodose.eu) [1] e *RENEB* (*Realizing the European Network of Biological Dosimetry*, <http://reneb.eu>) [3] che hanno coinvolto un numero elevato di istituzioni, incluse ENEA e Istituto Superiore di Sanità (ISS) già inserite nella rete europea di dosimetria *EURADOS*.

Attualmente questo approccio è portato avanti attraverso due reti europee, *RENEB* (*Running the European Network of Biological and Physical Retrospective Dosimetry*, nata dal progetto omonimo) [4] ed EURADOS (<http://www.eurados.org>), in grado di collaborare per lo sviluppo di nuove metodiche e il mantenimento di quelle consolidate allo scopo di far fronte alle emergenze legate a incidenti radiologici con un numero di potenziali vittime da

sottoporre a screening così elevato da superare la capacità di un singolo laboratorio.

A livello internazionale esiste inoltre anche *BIODOSENET* (<http://www.biodosenet.net>) [5], un consorzio di stati associati creato dall'Organizzazione Mondiale della Salute (OMS), al quale partecipano per l'Italia anche ENEA e ISS, che, a livello volontario, si rendono disponibili ad affrontare in maniera coordinata le emergenze nucleari.

Ringraziamenti

Gli Autori desiderano ringraziare tutte le persone che hanno attivamente collaborato alla realizzazione delle attività descritte nell'articolo. In particolare: Paola Fattibene, Cinzia De Angelis, Sara Della Monaca, Maria Cristina Quattrini dell'ISS e Clarice Patrono, Valentina Palma dell'ENEA.

BIBLIOGRAFIA

1. P. Fattibene and A. Wojcik (2009) "Biodosimetric tools for a fast triage of people accidentally exposed to ionising radiation", *Annali ISS*, 45, n. 3, Editore ISS, Roma
2. IAEA (2011) "Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies", Vienna, Austria
3. U. Kulka et al. (2012) "Realising the European Network of Biodosimetry (RENEB)", *Radiation Protection Dosimetry*, 151(4), 621-5, Oxford Academic
4. U. Kulka et al. (2017), "RENEB – Running the European Network of biological dosimetry and physical retrospective dosimetry: RENEB-Status quo", *International Journal of Radiation Biology*, 93, 2-14, Taylor & Francis
5. WHO (2007) "Consultation on the Development of global biodosimetry laboratories network for radiation emergencies: BioDoseNet"
- Meeting Report Ginevra, Svizzera

La protezione dal radon nelle abitazioni e nei luoghi di lavoro

Il radon è un fattore di rischio accertato per il tumore polmonare ed è la principale fonte di esposizione della popolazione a radiazioni ionizzanti. L'Italia ha dal 2002 un Piano Nazionale Radon, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità. La Direttiva 2013/59/Euratom sulla radioprotezione, in corso di recepimento, rafforza le disposizioni sul radon nei luoghi di lavoro e nelle abitazioni

DOI 10.12910/EAI2017-054

di **Carmen Carpentieri, Gennaro Venoso e Francesco Bochicchio, Istituto Superiore di Sanità, Silvia Penzo e Francesco Cardellini, ENEA**

Il radon è un gas radioattivo presente in natura, in particolare nel suolo, nell'acqua e in alcuni materiali da costruzione. Da tali sorgenti il radon può muoversi e penetrare negli edifici (abitazioni, scuole, luoghi di lavoro), dove può accumularsi raggiungendo concentrazioni anche molto elevate, mentre all'aperto si diluisce in un volume d'aria molto elevato, e le conseguenti basse concentrazioni non costituiscono un rischio sanitario rilevante. L'esposizione al radon negli ambienti chiusi rappresenta la principale fonte di esposizione della popolazione alle radiazioni ionizzanti ed è un fattore di rischio accertato per il tumore polmona-

re, essendo classificata dal WHO-IARC nel gruppo 1 dei cancerogeni. Ciò risulta da studi epidemiologici di coorti di minatori e, più recentemente, da studi epidemiologici di popolazioni esposte al radon nelle loro abitazioni, che hanno evidenziato anche una forte sinergia tra radon e fumo di sigaretta. In particolare, tali studi hanno dimostrato l'evidenza di un aumento di rischio di tumore polmonare anche (per esposizioni prolungate di 10-30 anni) a livelli di concentrazione di radon medio-bassi (inferiori a 200 Bq/m³) e stimato un aumento di rischio di tumore polmonare del 16% per ogni 100 Bq/m³ di incremento di concentrazione media di radon

(e tenendo conto delle incertezze questa stima varia da 5% al 31%). In Italia, l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha stimato che circa 3.400 casi annui di tumore polmonare (su un totale di oltre 30.000) siano attribuibili al radon [1], in termini percentuali ciò rappresenta circa il 10% di tutti i decessi per tumore polmonare in Italia. Questa percentuale varia da Regione a Regione da 4% a 16%, in relazione ai livelli medi di concentrazione di radon. Inoltre la maggior parte dei casi di tumore al polmone si stima avvenga tra i fumatori (Figura 1), in quanto il rischio di contrarre un tumore polmonare causato dall'esposizione al radon è, nei maschi, 25 volte



più alto per chi fuma un pacchetto al giorno di sigarette rispetto a chi non ha mai fumato. In Europa, l'esposizione al radon è stimata essere responsabile di circa il 9% di tutti i decessi per tumore polmonare [2]. Proprio sulla base degli studi epidemiologici più recenti, che hanno valutato un rischio più elevato che in precedenza, sono state emanate nuove raccomandazioni internazionali più restrittive, a cominciare dall'OMS che, nel 2009, raccomanda per le abitazioni un livello di riferimento di 100 Bq/m³ e comunque non superiore a 300 Bq/m³, fino alla più recente (2014) revisione delle raccomandazioni dell'ICRP in materia di protezione dal radon – in cui si raccomanda un approccio complessivo che in prima istanza consideri sia per le abitazioni che per i luoghi di lavoro un livello di riferimento non superiore a 300 Bq/m³.

In ambito normativo europeo, la principale novità di questi ultimi anni è la pubblicazione, il 17

gennaio 2014, della direttiva sulla radioprotezione, la 2013/59/Euratom, che per la prima volta integra la protezione dal radon nella stessa struttura normativa della protezione dalle radiazioni ionizzanti [3].

Gli elementi principali della direttiva connessi al radon sono i seguenti: i) l'introduzione per la prima volta di prescrizioni per le abitazioni (precedentemente oggetto solo di una raccomandazione risalente al 1990); ii) il rafforzamento delle prescrizioni per i luoghi di lavoro (introdotte in modo generico nella precedente Direttiva 29/96/Euratom, recepita in Italia con il D.Lgs. 241/2000); iii) la richiesta che gli Stati membri adottino uno o più livelli di riferimento sia nelle abitazioni sia nei luoghi di lavoro, in ogni caso non superiori a 300 Bq/m³ (nella normativa italiana attuale vi è un livello di azione di 500 Bq/m³ per i soli luoghi di lavoro); iv) l'obbligo, per gli Stati membri, di dotarsi di un piano nazionale radon (su cui la direttiva dà dettagliate in-

dicazioni) da aggiornare periodicamente.

In Italia, per ridurre il rischio di tumore polmonare connesso all'esposizione al radon, il Ministero della Salute ha già in passato affidato all'ISS il coordinamento del Piano Nazionale Radon, predisposto dallo stesso ministero nel 2002, affidando all'ISS, dal 2005, anche la gestione di diversi progetti specifici per la realizzazione di molte delle azioni previste dal Piano Nazionale Radon, tra cui:

- a) la costituzione del Gruppo di Coordinamento Nazionale Radon (GCNR) e di diversi gruppi di lavoro, con la partecipazione di esperti e rappresentanti delle strutture nazionali e regionali coinvolte;
- b) lo sviluppo e mantenimento presso l'ISS dell'Archivio Nazionale Radon, contenente informazioni riguardanti le attività relative al radon svolte dagli enti istituzionalmente preposti (campagne di misura della concentrazione di radon, attività di informazione della popolazione e di formazione degli operatori, atti regolatori ecc.) e dati relativi alle misure di concentrazione di radon effettuate

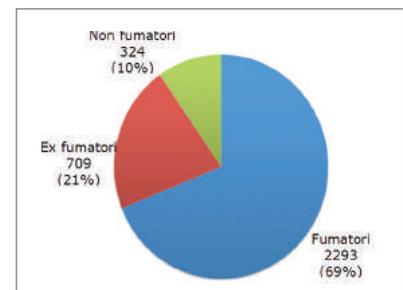


Fig. 1 Numero di tumori al polmone attribuibili al radon separati per categorie di fumo

in Italia (tra cui quelle effettuate dal Servizio Radon dell'ENEA di Bologna, vedi riquadro **Il Servizio Radon dell'ENEA-IRP**), ottenute in molti

Il Servizio Radon dell'ENEA-IRP

Nel 2002, dopo l'entrata in vigore del D.Lgs. 241/2000, l'ENEA, tramite il suo Istituto per la Radioprotezione (IRP), istituì il Servizio valutazione della concentrazione di radon in aria, ovvero Servizio Radon (SR), con l'obiettivo di completare l'offerta dei servizi di radioprotezione dell'IRP e mettere a disposizione del sistema paese quanto richiesto dalla normativa in materia. In particolare, il SR fornisce ai datori di lavoro, soggetti alla norma che disciplina l'esposizione a sorgenti naturali di radiazioni ionizzanti (capo III-bis, D.Lgs. 230/95 e s.m.i.), una struttura riconosciuta idonea per le misure di radon.

Nell'ambito delle attività del servizio, un nuovo sistema integrato di misura passiva del radon è stato sviluppato nel corso degli anni. Realizzato completamente nei laboratori dell'IRP, tale dispositivo consiste di un rivelatore a tracce nucleari (di tipo CR-39) e di un sistema di analisi automatica di immagini acquisite da un microscopio ottico. Progettato in modo da ot-

timizzarne sia la qualità della misura che la potenziale capacità di servire una larga utenza, il rivelatore è usato, a partire dal 2002, come strumento dell'IRP per la misurazione della concentrazione di radon.

Dal 2003, l'IRP svolge attività di dosimetria (*ope legis*) anche per esercenti esterni. Recentemente, le richieste di valutazione della concentrazione di radon sono aumentate in modo rilevante, specialmente per le abitazioni, indice che la sensibilità verso questo problema è in una fase di crescita, anche grazie alle azioni di informazione effettuate nell'ambito del PNR. Periodicamente i dati vengono inviati all'Archivio Nazionale Radon.

In questo contesto ENEA-IRP fa la sua parte, collaborando con tutte le istituzioni o associazioni, che vogliono comunque portare ad una migliore definizione della consistenza di tale problema nei diversi territori, contribuendo ad una migliore e corretta informazione sui rischi legati all'esposizione al radon della popolazione.

casi avvalendosi dell'ENEA-INMRI per la taratura della strumentazione (vedi riquadro *L'Istituto Nazionale di Metrologia delle Radiazioni Ionizzanti (INMRI-ENEA)*, nonché alle azioni di risanamento;

c) lo sviluppo delle attività di misura della concentrazione di radon negli edifici, sia tramite il supporto dell'ISS alla pianificazione di alcune indagini regionali sia tramite l'effettuazione di una nuova indagine nazionale che ha coinvolto tutte le Province italiane;

d) la valutazione per ogni Regione dei rischi associati all'esposizione al radon, separatamente per le diverse categorie di abitudine al fumo di sigaretta;

e) la realizzazione di linee guida sulle modalità costruttive dei nuovi edifici per ridurre in essi l'ingresso del radon proveniente dal suolo;

f) la realizzazione del sito web "Il radon e il Piano Nazionale Radon" (<http://www.iss.it/radon>) per la diffusione di informazioni alla popolazione e agli operatori.

Nello stesso periodo, diverse Regioni hanno effettuato attività su vari aspetti del problema radon, generalmente in linea con le indicazioni del Piano Nazionale Radon e spesso in diretta collaborazione con l'ISS.

I lavori per il recepimento della Direttiva 2013/59/Euratom sono in corso e dovranno concludersi entro febbraio 2018, compresa la predisposizione di un nuovo Piano Nazionale Radon.

Dato il notevole aumento di obblighi in materia, che coinvolgeranno sia i luoghi di lavoro che le abitazioni, è necessario, per rispettare tali obblighi, uno grande sforzo coordinato che coinvolga adeguatamente anche le Regioni che hanno effettuato meno attività in materia rispetto ad altre.

In conclusione, l'obiettivo a lungo termine è di ridurre l'incidenza di tumori polmonari attribuibili all'esposizione al radon della popolazione.

Anno	N. dispositivi	N. misure	Misure in luoghi di lavoro	Misure in abitazioni
2014	1365	3050	73%	27%
2015	780	1665	74%	26%
2016	893	1960	92%	8%
2017 (*)	1394	3010	95%	5%

* fino a 31/07/2017

Tab. 1 Attività degli ultimi anni del Servizio Radon ENEA

L'Istituto Nazionale di Metrologia delle Radiazioni Ionizzanti (INMRI-ENEA)

L'INMRI-ENEA, in quanto istituto metrologico, ha il compito di promuovere la qualità, l'affidabilità e la standardizzazione nelle misure delle radiazioni ionizzanti, tra cui le misure di radon realizzate nel paese.

A tale scopo, nei laboratori dell'INMRI-ENEA, è stato realizzato ed è operante il campione primario per le misure di radon in aria, utilizzato per la taratura di monitori di riferimento e/o la misura della attività di sorgenti di radon.

La taratura dei monitori dei committenti viene prevalentemente realizzata in una apposita camera radon del volume di circa 140 litri (L). Il monitor da tarare è collocato nella camera radon dove viene introdotta una quantità di radon variabile in funzione della concentrazione di attività a cui indicativamente si intende operare, generalmente comprese tra 1.500 e 10.000 Bq m⁻³, ma si possono effettuare tarature fino a 120.000 Bq m⁻³.

Il valore di riferimento della concentrazione di radon viene dato dal monitor primario collegato esternamente ad essa mediante un circuito chiuso. Il monitor primario opera esattamente nelle stesse condizioni con cui è stato tarato nel circuito primario, per rendere minime le incertezze sul valore della concentrazione di attività di radon che è del 2%. L'incertezza con cui viene tarato il monitor del committente dipende ovviamente dalle caratteristiche del monitor in esame. Si effettuano circa 5÷10 tarature di monitori commerciali ogni anno.

Le esposizioni di dosimetri passivi sono prevalentemente realizzate a concentrazione di radon costante nella camera radon da 1 m³ oppure a concentrazione di radon in crescita nella camera radon da 220 L. Complessivamente si effettuano tra le 20 e 30 esposizioni l'anno a valori compresi tra 150 e 12.000 kBq m⁻³ h. L'incertezza sul valore di esposizione certificata è pari al 6% per le esposizioni a valori molto bassi (<200 kBq m⁻³ h) e al 3% per le esposizioni comprese tra 1.500 e 3.500 kBq m⁻³ h.

ne, sia nelle abitazioni che nei luoghi di lavoro. Tale obiettivo può essere raggiunto attraverso l'adozione di:

- azioni di riduzione della concentrazione di radon negli edifici esistenti, agendo prioritariamente, ma non esclusivamente, nelle

aree ove i livelli di concentrazione di radon risultano essere maggiori;

- azioni di prevenzione in tutti i nuovi edifici, introducendo in fase di costruzione semplici ed economici accorgimenti finalizzati a ridurre l'ingresso del radon. Inoltre,

tenendo conto dell'effetto combinato del radon e del fumo di sigaretta, l'obiettivo si può raggiungere anche con azioni volte a ridurre il numero di fumatori nella popolazione. Ovviamente l'approccio più efficace consiste nell'applicare tutte le azioni di cui sopra.

BIBLIOGRAFIA

1. F. Bochicchio et al. (2013), Quantitative evaluation of the lung cancer deaths attributable to residential radon: a simple method and results for all the 21 Italian Regions, *Radiation Measurements*, 50: 121-126
2. S. Darby et al. (2005), Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies, *BMJ* 330: 223-226
3. European Commission (2014), Council Directive 2013/59/Euratom of 5 Dec. 2013. Laying Down Basic Safety Standards for Protection against the Dangers Arising from Exposure to Ionising Radiation, and Repealing Directives 89/618/Euratom, 90/641/Euratom, 96/29/Euratom, 97/43/Euratom and 2003/122/Euratom, *Official Journal of the European Union*, 57(L13): 1-73, 17 January 2014 (2014)

Le sfide per la comunicazione del rischio in ambito sanitario

La comunicazione del rischio è stata spesso intesa come strumento di persuasione, trasferimento di informazioni da un emittente esperto ed autorevole a individui privi di competenza scientifica. La nascita di molteplici culture del rischio elaborate da gruppi e organizzazioni sociali ha reso obsoleta la comunicazione unidirezionale e rende necessario uno scambio d'informazioni aperto, bidirezionale e negoziato tra vari attori, volto a creare relazioni di fiducia reciproca tra cittadini e Istituzioni e a costruire un pubblico informato e consapevole, in grado di prendere autonomamente le decisioni migliori

DOI 10.12910/EAI2017-055

di **Andrea Cerase**¹

Il concetto di rischio si è imposto come una lingua franca che pervade capillarmente discorsi e pratiche sociali, diventando una chiave per comprendere le *culture* della tarda modernità. Sin dalla pubblicazione del volume di Ulrich Beck, a metà degli anni ottanta, le cinque tesi esposte nella *società del rischio* (Beck, 2000) hanno segnato una netta discontinuità con il passato, che ha reso necessaria una continua *critica autoriflessiva* di apparati concettuali, categorie e saperi necessari a comprendere e governare i rischi, che va necessariamente este-

sa ai modelli e alle strategie della comunicazione del rischio.

La società del rischio e la comunicazione del rischio: lo scenario socioculturale

Ai fini di questo lavoro saranno trattati soltanto alcuni aspetti, particolarmente rilevanti per la comunicazione del rischio: 1) la secolarizzazione della scienza e dei saperi esperti; 2) la dialettica tra la centralità culturale del rischio e la differenziazione delle culture del rischio; 3) la tendenza ad indivi-

dualizzare le scelte per eliminare o mitigare i rischi.

Primariamente, la società del rischio si caratterizza per una generalizzata erosione della fiducia nei confronti di scienza e tecnologia, accusate non solo di non aver controllato efficacemente i rischi ma di averne prodotti altri ancora più gravi. Questo fenomeno, che riguarda anche le scienze mediche, è individuato da diversi autori come un aspetto tipico dell'attuale fase di modernizzazione. Non a caso si è parlato di *declino della deferenza* per segnalare la perdita di fiducia del pubblico nei confronti della



scienza e delle istituzioni pubbliche. Paradossalmente, la difficoltà di valutare e gestire efficacemente i rischi ha promosso una crescente domanda di certezza e di sicurezza che ha finito per radicalizzarsi nella distopia di una società virtualmente esente da rischi: la *zero risk society*.

In secondo luogo, il rischio sta diventando una cornice culturale unificante: l'allargarsi della semantica del rischio a un insieme di fenomeni ampi e differenziati ha consentito di dare una forma discorsiva coerente al manifestarsi della strutturale incertezza del nostro tempo, che non riguarda solo i pericoli legati a scienza e tecnologia, ma anche crisi economiche, instabilità politica, terrorismo, criminalità, immigrazione. I rischi sono diventati sempre più invisibili e immateriali, perdendo la loro aura di calcolabilità fino ad acquisire un inedito potenziale catastrofico. Tuttavia, la centralità del rischio produce risposte diversificate: gruppi e organizzazioni sociali elaborano *culture del rischio* estremamente fluide e diversificate, che fanno riferimento a una pluralità di norme, valori e credenze radicate nei diversi gruppi e contesti sociali.

Infine, uno degli aspetti più caratterizzanti della *società del rischio*

riguarda i processi di individualizzazione, che ne costituiscono uno scenario obbligato. La frammentazione delle culture del rischio e la spinta all'individualizzazione si legano ad un ridimensionamento del ruolo dello Stato nel controllo dei pericoli, mettendo in capo agli individui maggiori responsabilità nel prendere decisioni su come gestire i rischi. La necessità di ridurre le conseguenze del rischio "mettendosi al sicuro" è così diventata un imperativo culturale e morale (Lupton, 1995) che media anche il rapporto con la salute. Dall'alimentazione alla forma fisica, dalla prevenzione ai mezzi di trasporto, dalla sessualità alle relazioni interpersonali sembra non esserci aspetto della nostra vita che non implichi forme di valutazione del rischio, richiamando continuamente gli individui a occuparsi della gestione di rischio per qualsiasi cosa, fino a trasformarli nei *risk manager* di sé stessi.

La salute diventa così un bene prevalentemente *privato*, e non più necessariamente *pubblico*, come evidenziano le controversie sui vaccini (Petts e Niemeier, 2004). La pervasività e la rilevanza di simboli, pratiche e manufatti che incorporano l'idea di rischio evidenziano al tempo stesso le difficoltà

di orientamento degli individui e il carattere ambiguo e intrinsecamente fragile dei saperi e delle conoscenze che dovrebbero informare il dibattito e le politiche pubbliche, chiamando direttamente in causa obiettivi e funzioni della comunicazione del rischio.

Nuove metafore della rischiosità del rischio

Per comprendere meglio la portata di questi cambiamenti è forse utile un esempio. Capita sempre più spesso di trovare in farmacia cornette per smartphone o neutralizzatori di campi elettromagnetici che, utilizzando un lessico parascientifico o un packaging ispirato a quello dei farmaci, promettono di "abbattere le emissioni elettromagnetiche durante le chiamate" o di "agire come scudo protettivo generando delle onde di risonanza". Al di là dell'efficacia di queste tecnologie, la mera esistenza di simili prodotti ha importanti implicazioni per la comprensione e la comunicazione dei rischi.

In un contesto saturo di messaggi sul rischio la legittimazione scientifica diventa un aspetto quasi secondario: letto nel quadro della differenziazione delle culture del rischio, l'aneddoto dimostra non solo la rilevanza della paura e la problematica dipendenza dai *saperi esperti* ma anche come la moltiplicazione delle *pretese di verità* alternative alla scienza tradizionale renda sempre più difficile distinguere le costruzioni discorsive dalla disinformazione intenzionale, opacizzando il ruolo delle ideologie sottese alla lotta per le stesse definizioni della realtà sociale: di fronte alla possibilità di conseguenze "serie e irreversibili" non conta solo ciò che si può dimostrare, ma anche ciò che "si può solo immaginare, dubitare, presumere o temere" (Ewald, 1999: 64).

Vecchi modelli, assunti impliciti: oltre la “corretta” comunicazione del rischio

Nella sua schematicità, questo scenario segnala un quadro difficile per la comunicazione dei rischi: in una situazione così articolata e conflittuale, se mancano competenze comunicative riconoscibili e chiari riferimenti al dibattito internazionale, la comunicazione del rischio tende ad adagiarsi su modelli obsoleti, che fanno riferimento a un modello di società ormai dissolto. Per quanto possa apparire superata e inadeguata, la visione carica di ottimismo di una società di massa basata sul consenso democratico, ben ordinata e inevitabilmente destinata al progresso (Shils, 1957) continua ancor oggi ad influenzare il dibattito su questi temi, e non di rado informa strategie e pratiche comunicative inefficaci o addirittura controproducenti. Entro questa idea generale di società, scienza ed ambiente, la comunicazione del rischio è prevalentemente intesa come strumento di persuasione, volto a *correggere* comportamenti e stili di vita ritenuti *sbagliati*, associandosi quasi invariabilmente ad un modello di comunicazione lineare, gerarchico, unidirezionale e deterministico, che postula la comunicazione come trasferimento di informazioni da un emittente esperto ed autorevole ad una serie di destinatari atomizzati, privi di competenza scientifica e dunque inclini all'irrazionalità e all'emozionalità. In mancanza di solidi background e precise caratterizzazioni, nella comunicazione del rischio si tende a dare per scontati una serie di assunti non verificati sui ruoli di emittente e destinatario, sul contenuto dei messaggi, sul processo di diffusione e sugli effetti attesi. Ad esempio, nelle campagne istituzionali sull'AIDS,

nonostante il tendenziale abbandono dei toni allarmistici delle prime campagne (*se lo conosci lo eviti*) continua a prevalere il pedagogismo, che si accompagna alla difficoltà di parlare esplicitamente di preservativi e di individuare target e obiettivi specifici. Con poche eccezioni, il dibattito sul tema in Italia è ristretto a pochi specialisti, risentendo di un certo ritardo rispetto ad altri Paesi. Inoltre, si tende a dare poco peso alla mole di conoscenze che hanno segnato l'evoluzione della comunicazione del rischio come disciplina autonoma, con il risultato di ricominciare ogni volta da capo, “reinventando la ruota” (De Marchi, 2004).

Le sfide per la comunicazione dei rischi sanitari

Negli ultimi vent'anni o poco più le istituzioni sanitarie di tutto il mondo hanno dovuto fronteggiare una lunga serie di crisi sanitarie, caratterizzate da una portata globale e dal ruolo centrale giocato dai media e più in generale dalla comunicazione: la sindrome della mucca pazza (1996), l'influenza aviaria in Asia (1998-2000), il virus West Nile (1999-2000) e H1N1 (2009) fino alle recenti epidemie di Ebola in Africa centrale (2014/2015) e alla preoccupante diffusione del virus Zika (2016). A questi eventi estremi si aggiungono le crescenti preoccupazioni per la diffusione dell'obesità, del diabete e dell'abuso di alcool tra i giovani, senza dimenticare la crescente politicizzazione delle questioni legate ai vaccini e al movimento FreeVax come anche il *faddismo* nel campo dell'alimentazione o del benessere. Tratto comune a tutti questi fenomeni è il ruolo della comunicazione che, sia attraverso i tradizionali canali broadcast sia i media digitali, contribuisce in modo sostanziale a

costruire il significato sociale dei rischi, amplificandone o attenuandone le conseguenze (Pidgeon, Kasperson e Slovic, 2003).

In forza di questo mutamento di prospettiva il ruolo, i modelli e le finalità della comunicazione del rischio sono profondamente cambiati, orientandosi principalmente verso uno scambio d'informazioni aperto, bidirezionale e negoziato tra vari attori, volto a creare relazioni di fiducia reciproca tra cittadini e Istituzioni e a costruire un pubblico informato e consapevole, in grado di prendere autonomamente le decisioni migliori. Questo mutamento di paradigma si è peraltro tradotto nel progressivo abbandono della logica della persuasione e da una crescente attenzione al contesto socio-culturale quale dimensione cruciale per comprendere le risposte ai rischi di individui e gruppi.

Per questa via, la comunicazione dei rischi sanitari tende sempre più a configurarsi come *luogo della complessità*, soprattutto laddove non c'è (più) consenso condiviso né sull'efficacia delle tecnologie sanitarie né sul significato morale di parole come prevenzione, diagnosi e cura. La crescente tendenza alla politicizzazione dei rischi, così come la costruzione antagonistica di specifiche cornici di senso (*frame*) si legano infatti all'emergere di specifiche visioni del mondo in competizione tra loro, che rendono indispensabile una analisi strategica delle concezioni socialmente condivise del *giusto* e del *desiderabile* e del modo in cui esse si applicano alla salute².

La comunicazione dei rischi sanitari si caratterizza pertanto come un campo sempre più conflittuale, che rende necessaria una visione strategica dei processi comunicativi e richiede specifiche competenze e abilità: il mutamento di paradigma e il consolidamento della comuni-



cazione del rischio come disciplina accademica e professionale autonoma hanno richiesto molti anni, ed è stata necessaria la creazione di riviste specializzate³, la stretta cooperazione tra gruppi accademici e la creazione di centri di ricerca e formazione specializzati, spesso in collaborazione o con un supporto attivo delle Istituzioni in veste di finanziatori o partner in specifici progetti. Come accennato, in Italia questo processo non si è ancora pienamente realizzato e il livello complessivo delle esperienze avviate non appare comparabile a quello di Stati Uniti, Regno Unito e paesi dell'Europa

settentrionale, sebbene la posta in gioco e le aspettative siano per molti versi simili.

Questo processo pone una particolare enfasi sulla valorizzazione della conoscenza e del capitale intellettuale che, in contesti organizzativi e istituzionali *knowledge-intensive*, caratterizzati dalla necessità di ridurre o gestire una forte incertezza ambientale e contestuale, appaiono come *asset* indispensabili per testare e utilizzare al meglio le strategie di comunicazione del rischio, a maggior ragione in situazioni incerte. La costruzione di solide basi teoriche e lo stretto legame con la ricerca em-

pirica diventano così i cardini per la progettazione strategica e per la messa a punto di *linee guida, protocolli e buone pratiche*. Alla definizione degli approcci teorici e degli orientamenti strategici, andrebbe tuttavia affiancato un costante lavoro di monitoraggio e valutazione dei risultati delle azioni di comunicazione, consentendo non solo un progressivo riaggiustamento degli strumenti ma anche della stessa teoria, al fine di comprendere e valorizzare anche le conoscenze implicite dei professionisti e di integrare il loro punto di vista entro un approccio in grado di conciliare il rigore e la rilevanza applicativa.

¹ PhD in Scienze della Comunicazione e Relazioni pubbliche e esperto di Comunicazione del Rischio, attualmente assegnista di ricerca presso il Centro Allerta Tsunami dell'Istituto Nazionale di Geofisica e Vulcanologia di Roma

² Può essere utile segnalare il modo in cui il movimento FreeVax ha costruito il proprio *frame* nel dibattito sull'obbligo vaccinale, enfatizzando oltre misura l'aspetto di pretesa coercizione della volontà e libertà individuale attraverso un insistito e sistematico riferimento alla disciplina dello Stato Nazionalsocialista, alla sua concezione della sanità e ai disumani esperimenti condotti da Joseph Mengele e altri medici sui bambini nei campi di sterminio. Ad oggi (agosto 2017) non risultano tentativi da parte delle autorità sanitarie di intervenire su Facebook o su Twitter per contrastare questo tentativo di framing

³ Si vedano ad esempio *Journal of health communication, Health, risk society, Social Science and Medicine, Critical public health*

BIBLIOGRAFIA

- Beck, U. (2000a). *La società del rischio. Verso una seconda modernità*, Carocci, Roma [1986]
- De Marchi, B. (2004). Alleanze interdisciplinari e partecipazione pubblica per la governance di vecchi e nuovi rischi, in Bevitori, P. (a cura di). *La comunicazione dei rischi ambientali e per la salute*. Franco Angeli, Milano, pp. 17- 36
- Ewald, F. (1999). Return of the Crafty Genius: An Outline of a Philosophy of Precaution, *The Connecticut Insurance Law Journal*, 6, pp. 47-79
- Lupton, D. (1995). *The Imperative of Health: Public Health and the Regulated Body*. Sage. London
- Petts, J., & Niemeyer, S. (2004). Health risk communication and amplification: learning from the MMR vaccination controversy. *Health, risk & society*, 6(1), pp. 7-23
- Pidgeon, N.; Kasperson R. E.; Slovic, P. (a cura di). *The social amplification of risk*, Cambridge University Press, Cambridge
- Shils, E. (1957). Daydreams and nightmares: Reflections on the criticism of mass culture. *The Sewanee Review*, Vol. 65, No. 4 (Oct. - Dec), pp. 587-608

Epigenetics and the environment

Recent studies revealed that epigenetic changes may be associated with aging and exposure to various environmental, dietary and lifestyle risk factors. Therefore, epigenetic changes that are risk factor-specific (“fingerprints”) may be instrumental in the discovery of new biomarkers for early diagnosis, prognosis and risk stratification, but also new targets for epigenetics-based therapies and prevention

DOI 10.12910/EAI2017-056

by **Ettore Meccia** and **Eugenia Dogliotti**, *Istituto Superiore di Sanità*; **Zdenko Herceg**, *International Agency for Research on Cancer*

If our genome would be solely a static combination of four nucleotide bases, we could not explain the diversity of cell types that characterize our tissues/organs but share an almost identical genome sequence.

What is epigenetics

This is because the fate of cell development and therefore the cell status is not only a matter of sequence but epigenetic modifications will contribute significantly to cell diversity by regulating global gene expression. These modifications occur on DNA and histones without involving a change in DNA sequence but creating “tags” that alter DNA accessibil-

ity and chromatin structure, thereby leading to a sophisticated level of genetic control. The principal epigenetic tag found in DNA is methylation at the 5'-position of cytosine in CpG dinucleotide sequences. CpG methylation can suppress transcription by blocking DNA recognition and binding by some transcription factors. The N-terminal tails of histone proteins are subject to a wide range of different post-translational modifications (PTMs), including acetylation, methylation, phosphorylation and ubiquitylation. The PTMs made to histones can have a substantial influence on chromatin structure and gene function determining what is known as the histone code. DNA methylation tags also promote the

persistence of certain histone states thus providing a mechanism for perpetuating histone PTMs. These epigenetic mechanisms regulate also the expression of short non-coding RNA, micro RNAs (miRNAs), of which a subset can in turn control the expression of important epigenetic regulators such as DNA methyltransferases and histone deacetylases. This creates a complicated chromatin-miRNA regulatory circuit able to organize the whole gene expression profile.

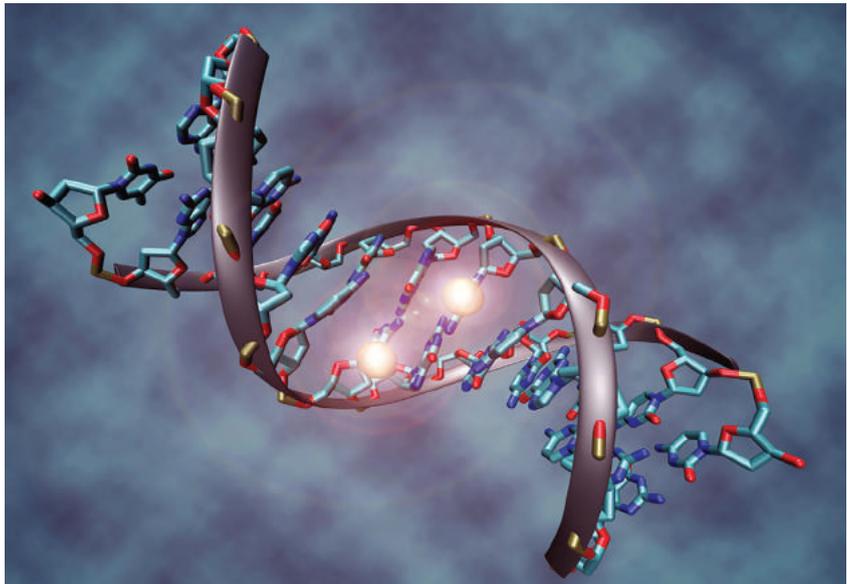
DNA methylation is both an effector and a biomarker of exposure

Epigenetic inheritance includes three distinct self-reinforcing

mechanisms: DNA methylation, histone modifications and RNA-mediated gene silencing DNA methylation at CpG dinucleotides is carried out by a family of enzymes known as DNA methyltransferases (DNMTs). Methylcytosine is often referred to as the fifth base that forms the “DNA methylation code” and is recognized as a principal mechanism for propagating transcriptional repression and participation in the maintenance of specific chromatin states. DNA methylation plays multiple roles in cellular processes including regulation of gene expression and cellular defense against parasitic DNA sequences such as viruses. In normal cells, DNA methylation marks are concentrated in transposons and repetitive sequences but are virtually absent at gene promoter regions. However, CpG islands that are typically unmethylated in normal cells are often hypermethylated in tumor cells, a finding associated with abnormal silencing of tumor suppressor genes and other cancer-associated genes. Recent studies have provided a wealth of evidence that DNA methylation plays an important role in the development and progression of virtually all types of cancer.

DNA methylation patterns are thus becoming increasingly attractive targets for biomarker discovery in diagnostics.

Recent studies revealed that DNA methylation changes may be associated with aging and exposure to various environmental risk factors. Therefore, epigenetic changes that are risk factor-specific (“fingerprints”) should prove instrumental in the discovery of new biomarkers of exposure in molecular epidemiology and population based study.



The epigenetic response to physiological and environmental factors

The interplay between transcription factors, nuclear receptors, chromatin remodeling factors (like histone acetyltransferases, histone acetylases, DNA methyltransferases and a growing number of cofactors) and the transcription machinery determines what has been described as the epigenetic landscape of a cell, corresponding to a specific transcriptional profile. Even few changes to the higher order chromatin structures can determine transcriptional changes to large sets of correlated genes. In this way, very different epigenetic landscapes can be achieved that have allowed the evolution of pluricellular organisms with cell type, tissue, and stage specific genetic information. During every biological process, like embryogenesis, myogenesis, or even carcinogenesis, epigenetic changes will allow a unique genotype to give rise to different stable phenotypes, accounting

for different cell identities, functions and morphology.

The epigenetic changes responsible for this diversity are not embedded in the cell's genetic program. They are usually induced by the local or distal production of molecules like morphogens, hormones, cytokines or growth factors to which they respond through cellular receptors starting a signaling cascade ending in chromatin conformation changes in the nucleus.

Even many external factors like diet, nutrition and lifestyle can induce epigenetic changes. Lack or excess food, nutrients and natural hormones in our diet, hypoxia during altitude adaptation, temperature switches, sun light exposure, can induce changes to our epigenome. These changes can be reversible or inherited and responsible for cell type specificity, adaptation or the onset of pathological conditions. High fat diet, obesity, but even food shortage and famine have been linked to persistent epigenetic changes.

In summary, epigenetic changes are

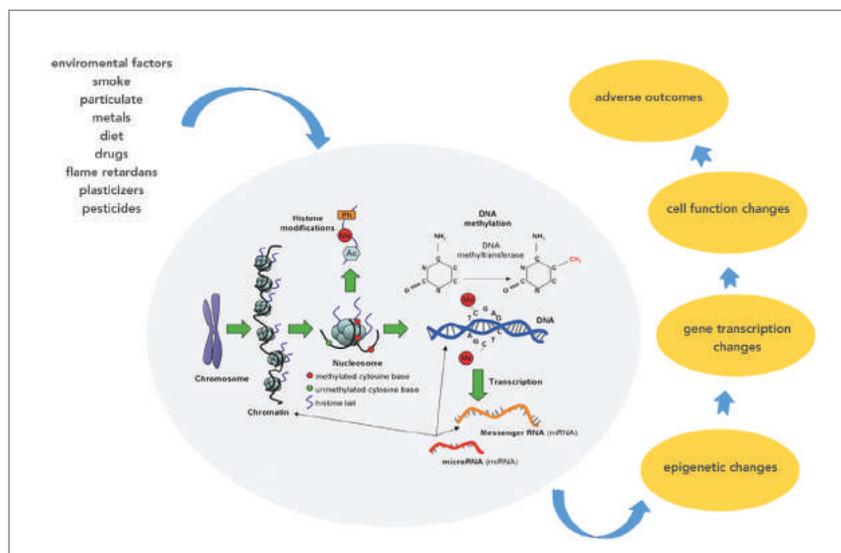
a way to convert external stimuli to internal changes at the cellular and molecular levels in terms of gene regulation and gene expression profile.

This responsiveness to external factors is the key to predict and understand the effects on the epigenome by contaminants present in our environment, food, drinking water even in very small concentrations, given they have the ability to determine a cellular response or to mimic cellular effectors.

Global epigenetic changes like DNA hypomethylation can in turn contribute to genetic changes like genetic instability and participate to cancer transformation. Even the dysregulated expression of oncogenes and tumor suppressor genes by changing their methylation status are a consequence of global changes to the epigenome. These events should be considered mechanisms of non-genotoxic carcinogenicity (NGC).

A completely different and very

specific mechanism of action is the binding of hormone-like environmental contaminants like Bisphenol A (BPA), Bisphenol AF (PBAF), Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) to nuclear hormone receptors instead of their physiological ligands. Many of these compounds have been shown to bind with sufficient affinity to nuclear receptors in an agonist manner thus exerting an inappropriate biological function affecting the epigenome. The ligand bound hormone receptor will enter the nucleus and bind to accessible hormone responsive elements (HRE), or switch its conformation status and change its associated cofactor set from corepressors to coactivators if already bound to the regulative regions of hormone-controlled genes. Either way the bound contaminant will disrupt the finely tuned action of hormones known to be produced or active at very low concentration and in narrow windows of sensitivity possibly deregulating the transcription status of critical genes involved in sensitive biological processes. For instance, the activity of some HOX genes during embryo development has been shown to be dysregulated by *in utero* exposure to estrogen-like compounds in a strict tissue specific manner. This results both in altered morphogenic processes and increased predisposition to hormone driven cancers later in life. Other mechanisms of toxicity for hormone-like compounds include increased signaling in hormone responsive cancer patients, or indirect mechanisms like the binding of some polybrominated flame retardants to the sulfotransferase SULT1E1 with consequent interference in the elimination of 17 β -estradiol and enhancing a non-



Exposure and epigenetics

As the epigenome can be considered a way to integrate and adapt to external physiological stimuli, the same applies to non-physiological factors such as many environmental contaminants. Many of these compounds have been shown or suspected to be able to induce changes to the epigenetic landscape of a cell thus altering its regulation and functions. There are many possible ways in which environmental contaminants

can induce changes to the epigenome at different levels.

Global and unspecific modifications have been linked to exposure related metabolic changes, like the arsenic induced shortage of the methyl donor S-adenosyl methionine (SAM) used to methylate and detoxify arsenic, leading to global hypomethylation. Other mechanisms inducing global hypomethylation include the inhibition of epigenetic factors like the DNA methyltransferases (DNMT) by arsenic and cadmium.

physiological estrogenic signaling. Being active at very low concentrations, in a tissue and cell mediated manner and causing associable effects mainly at later stages in life are all relevant factors to understand the importance and the difficulties of assessing hormone-like substances toxicity mediated by epigenetic mechanisms.

Cigarette smoke is a further worthwhile example of environmental contaminant able to induce epigenetic changes, for different reasons.

It is not a substance but it is a complex mix of substances, each one with its own mechanism of action like direct damage to DNA, enhanced cellular signaling, hypoxia, just to name a few.

Besides, it is a good model for the concept that environmental contaminants induced changes to the epigenome should be considered in their dual role of biomarkers of effect but even of potent effectors as, just like cigarette smoke, they can in turn determine or enhance the onset of pathological conditions like respiratory and cardiovascular diseases and cancer. Metabolic and neurological diseases are other examples

Major outcomes of of epigenetic deregulation. Cancer, metabolic diseases and inflammation

Accumulating evidence points to the key role of epigenetic changes in mediating gene-environment interactions and their effect on many complex human diseases. Deregulation of

the epigenome is a nearly universal phenomenon in human cancers and a key driver of many cancers. It is also increasingly recognized that nutrients, and their metabolites, may have a major impact on the epigenome, and be involved in the development of metabolic diseases, potentially leading to transgenerational alterations in the phenotype. Several important discoveries have led to growing interest in understanding the potential role of the epigenome deregulation in the mechanism underlying the development of obesity and its associated comorbidities. Furthermore, suboptimal maternal nutrition during pregnancy may have a marked effect on the fetal epigenome, which may constitute a risk for disorders in childhood and adulthood. New evidence from functional studies in model organisms and humans have implicated the deregulation of epigenetic mechanisms in different human neurodegenerative disorders. Many studies, including those on population-based cohorts revealed that epigenetic changes have a striking impact on the aging process. Finally, although there is little understanding of the role of epigenetic mechanisms in inflammation process, the molecular links between the epigenome states and various chronic inflammatory diseases have been established.

Conclusions

Almost spectacular progresses in epigenetics and epigenomics have contributed to a better understand-

ing of the etiology of human complex diseases, notably cancer. These advances have revealed that epigenetic changes have causal role in the development and progression of cancer and other diseases as well as in linking environmental exposure to the mechanisms underlying the disease. Many conceptual breakthroughs in epigenetics and the advent of powerful technological advances in epigenomics allowing the analysis of the epigenetic changes with high resolution in both genome-wide and high-throughput settings, have been fueling investigation of cancer research but also other related fields. Recent population based studies contributed to the identification of epigenetic alterations caused by specific environmental, dietary and lifestyle exposures, supporting the notion that the epigenome may function as an interface between the environment and the genome. Accumulating evidence that environmental exposures can induce specific changes in the epigenome provides the rationale that such epigenetic “fingerprints” may be instrumental in the discovery of new biomarkers for early diagnosis, prognosis and risk stratification, but also new targets for epigenetics-based therapies and prevention. Progress in studies of epigenetic alterations during cancer development and different complex human disease should open opportunities for the development of efficient epigenetics-based therapies for these diseases.



Global environmental changes and the impact on ecosystems and human health

Global environmental changes caused by human activities can modify, sometimes permanently, the structure and the composition of ecosystems (aquatic, land, air). The socio-economic evolution of recent decades has caused the release and emissions into ecosystems of multiple contaminants (chemical and microbiological). Their diffusion, interaction and effects on human health can be sometimes ignored. These changes have caused the progressive loss of biodiversity, the accumulation of contaminants in biota and a deterioration of the chemical and microbiological quality status of environmental matrices. In order to prevent future damage to ecosystems it is urgent to apply innovative, rapid, sensitive monitoring tools that can allow to identify the hazards and prevent risks to human health via appropriate management measures. In this paper, we provide an overview of some European and international approaches to deal with the certain challenges raised by global environmental changes

DOI 10.12910/EAI2017-057

by **Laura Mancini, Stefania Marcheggiani, Camilla Puccinelli, Ines Lacchetti and Mario Carere**, *Italian Institute of Health*, **Timothy Bouley**, *World Bank Group*

Environmental changes and human activities can affect the state of ecosystems and constitute a potential risk to human health and well-being. [1]. During recent decades, the increase of water supplies for industrial, irrigation and drinking uses, excessive land use and deforestation, hydro-morphological alterations, emissions of chemical contaminants in the environment (more than 100,000 registered by REACH in Europe) have changed, often permanently, the structure and the composition of ecosystems (aquatic, land, air) reducing biodiversity, accumulating contaminants in biota and resulting in a deterioration of chemical and microbiological quality of environmental matrices. WHO states that (<http://www.who.int/globalchange/environment/en/>) a new perspective is required which focuses on ecosystems and on the recognition that long-term good health in human populations rely mostly on the continued stability and functioning of the biosphere's life-supporting systems. Ecosystems are closely connected with the wellbeing and health status of the populations. And signals of ecosystem alteration or deterioration must be considered as an alarm by the policy makers to apply prevention measures to protect human health. There are several examples of ecosystem-human health connection. For instance, an enhanced accumulation of a bioaccumulative chemicals in aquatic organisms is a signal of a current or future impact on seafood, a change of bacteria composition in a lake can be an indicator of a current or future deteriorated quality status of a bathing water area, the reduction of biodiversity in a certain area can generate

a future decline of fishing activities and the decrease of the water level of a lake used for the abstraction of drinking water can impact the future water uses and the abundance of aquatic organisms. Moreover, equilibrium status of the natural and artificial aquatic ecosystems can be impaired by climate changes. An example are the effects of climate change on weather parameters such as temperature and rain that can cause changes of their distributions giving rise to extreme events such as floods, heat or cold waves [2]. In this paper we describe some examples of monitoring and adaptation approaches in relation to specific challenges caused by the global environmental changes to the ecosystems in a European and international perspective.

The European Approach

The European Water Framework Directive (WFD) [3] is an example of an ecosystem approach for the protection of aquatic ecosystems and human health. The EU WFD is possibly the most significant European legislative instrument in the water field. It is based on an ecosystem approach, aiming to protect the whole aquatic ecosystem including environment and human health. This Directive aims to achieve and ensure the "good ecological and chemical status" of all waterbodies (surface and ground) throughout Europe by 2026 through the updating and implementation of management plans at the river basin level and with the use of a science-policy strategy (Common Implementation Strategy), involving governments, policy makers, researchers, various stakeholders, industrial enterprises, and NGOs. The chemical status as-

essment and classification are based on the compliance with legally binding European environmental quality standards (EQSs) for selected chemical pollutants (priority substances) of EU-wide concern. EQSs for priority substances are set in the Directive 2008/105/EC, recently amended by the Directive 2013/39/EU [4]. EQSs are designed to protect the environment and human health. In the last years the WFD has also foreseen a mechanism (watch-list) to deal with the emerging chemical substances through the use of a monitoring system in selected monitoring stations at European level. The current watch-list [5] includes some emerging substances such as pharmaceuticals (e.g. diclofenac, E2, EE2) and antibiotics. The assessment of the ecological status takes into account the effects at population and community level, based on the use of specific indices and ecological quality ratios. Good ecological status of the WFD is defined in terms of the values of the biological quality elements (phytoplankton, macroalgae, angiosperms, benthic invertebrate fauna and fish), the hydrological and morphological conditions and physico-chemical elements. Good ecological status (or potential) requires also that the concentrations of the specific chemical pollutants (also called river basin specific pollutants) do not exceed the EQSs set at member state level.

The WFD requires three monitoring programmes:

- Surveillance monitoring: to supplement and validate the impacts analysis, to support the efficient and effective design of future monitoring programs and to assess long-term changes in natural conditions and changes result-

ing from anthropogenic activity. Monitoring is performed at least once every management cycle (usually every 6 years).

- **Operational monitoring:** to establish the status of those waterbodies identified as being at risk of failing to meet the WFD environmental objectives and to assess any change in the status resulting from the programs of measures.
- Investigative monitoring:** to determine the reasons for exceedances or predicted failure to achieve environmental objectives if the reasons are not already known and to determine the magnitude and impacts of accidental pollution.

Innovative European approaches recommended for monitoring ecosystems

Various projects related to aquatic ecosystems monitoring have been funded by the European Commission (<https://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/>). The tools for a rapid identification (<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC92395/lb-na26881enn.pdf>) of contaminants (chemical and microbiological) represent a great opportunity to implement preventive measures during the emergencies. An example is the European Project Horizon 2020 INTCATCH (*Development and application of Novel, Integrated Tools for monitoring and managing Catchments* <http://intcatch.eu/>) that has a main goal to recommend and deliver new innovative tools for the monitoring of surface waterbodies in Europe. The tools foreseen by INTCATCH include, *inter alia*, sensors related to heavy metals, nutrients, pH, temperature, pesticides, *Escherichia coli* and metagenomics. The

innovative approach that goes beyond the WFD current monitoring programs is based on the connection and integration of the sensors on autonomous and radio-controlled boat platforms. In the context of INTCATCH the use of Next generation sequencing (NGS) metagenomics has the potential to investigate any perturbation of the chemical and ecological status by rapidly determining the microbiome present in a specific waterbody. This genomic tool can give rapid responses in the case of emergencies increasing in frequency due to the effects of climate change. INTCATCH will be tested and validated with the support of stakeholders and citizens in Lago di Garda (Italy), the great Ouse and urban rivers London (UK), Ilyki lake (Greece) and Ter River (Spain). The most important requirements for a reliable analysis of the ecosystems are: specificity, sensitivity, reproducibility of results, speed, automation and low cost. In addition, the low concentration of contaminants (e.g. pathogenic agents, emerging chemical contaminants such as pharmaceuticals) in aquatic ecosystems require preliminary steps for the collection of large volumes of water and enrichment and concentration of the sample for their detection [6]. Microbiological parameters should deal with the fact that many microorganisms cannot be cultured or can enter in a vital but non-culturally-state (VBNC). Current microbiological monitoring methods are based on culture techniques that measure the growth or the metabolic status of a microorganism after an incubation period. The use of methods focused on the immunological or genetic characteristics of the microorganism would allow a rapid identification of specific microor-

ganisms within a few hours instead of the days required by traditional methods [7]. Molecular biological tools have now greatly enhanced the ability to investigate biodiversity by identifying species and estimating gene flow and distribution of species in time and space. The development of a universal microchip for simultaneous detection of a large number of pathogens in aquatic ecosystem is the main objective of the European project μ AQUA—Universal microarrays for the evaluation of fresh-water quality based on detection of pathogens and their toxins THEME [KBBE.2010.3.2-04] [Innovative aquatic biosensors—Call: FP7-KBBE-2010-4] funded by the 7th Framework Programme for Research & Technological Development http://cordis.europa.eu/project/rcn/99122_en.html.

This universal microchip is designed to detect various pathogenic agents (cyanobacteria, bacteria, viruses and parasitic protozoa) and their toxins in the waters. In addition, the project includes the identification of certain species of diatoms, which represent reliable bio-indicators to assess the overall water quality [8]. The molecular methods are developed by the MicroAQUA consortium mainly through the rational use of specific molecular probes combined into a universal microarray chip.

In relation to the chemical monitoring programmes the classical single-chemical risk assessment approach for the management of chemical pollution of waterbodies has some limitations highlighted by recent European projects (e.g. EU EDA-Emerge ITN-FP 7, EU Project Solutions www.solutions-project.eu) because it is not possible to analyze, detect and quantify all substances that are present in the aquatic en-

vironment. [9, 11]. Currently, more than 700 emerging pollutants, their metabolites and transformation products, are listed as present in the European aquatic environments by the Norman (Network of reference laboratories, research centres and related organizations for monitoring of emerging environmental substances) network www.norman-network.net. Emerging pollutants (EPs) are defined as synthetic or naturally occurring chemicals that are not commonly monitored in the environment but which have the potential to enter the environment and cause known or suspected adverse ecological and (or) human health effects. It is important to know which are the real effects [12] caused by the sum of the chemical substances in the aquatic environment (including emerging pollutants, metabolites and transformation products) and to link the observed effects with cost-effective management objectives. Furthermore, the substances present in the aquatic environment can form mixtures whose effects may not be predictable on the basis of chemical analyses alone. In the context of the WFD, a specific task was foreseen for the elaboration of a technical report [13] on aquatic effect-based tools (e.g. bioassays, biomarkers). The activity was chaired by Sweden and co-chaired by Italy and progressively involved several member states and stakeholders in an EU-wide drafting group of 47 experts. The report has been endorsed by the Strategic Co-ordination Group of the WFD and by the Water Director Meeting in Vilnius, Lithuania (December 2013) and aims to present the state of the art of aquatic effect-based monitoring tools and to describe in which way these tools can help EU member states to make more efficient moni-

toring programs (including reduction of monitoring costs). The tools described in the report are categorised into four main groups:

- Bioassays, in vitro and in vivo, which measure the toxicity of environmental samples under defined laboratory conditions, at cellular or organism levels, respectively
- Biomarkers, i.e. biological responses at the cellular or individual levels, measured in field exposed organisms
- Ecological indicators, measuring changes observed at higher biological organization levels, i.e. at population and/or community level
- OMICs (including metagenomics approaches). As mentioned in the WFD report, these effect-based tools can be used:
 - as screening tools to aid in the prioritisation of analysis of waterbodies,
 - to establish early warning systems,
 - to take into account the effects of chemical mixtures or chemicals that are not analysed (e.g. to support investigative monitoring where causes of a decline of specific species are unknown)
 - to provide additional support in water and sediment quality assessment

Approaches recommended for the adaptation to climate changes

The potential role and benefits of treated wastewater reuse as an alternative source of water supply is well acknowledged within international and European strategies [14], in particular in the areas where water

scarcity and droughts are likely to be severe and intense due to climate change. Water reuse is a priority area in the strategic legislative agenda of the European Commission and there is need to elaborate quality criteria that can guarantee the protection of human health and environment.

The use of treated wastewater (TWW) can cause negative effects on human health and environment [15]. TWW may contain hazards such as physical, chemical, radiological and microbial agents that can be a risk to human health and therefore, there is a need to define quality criteria and a control system for this type of water.

The EU Project FRAME <http://www.frame-project.eu/> (a novel framework to assess and manage contaminants of emerging concern in indirect potable reuse) is funded by the European research initiative “Water JPI (Joint Programming Initiative, Water Challenges for a Changing World). The FRAME project aims towards novel approaches to assess and manage IPR (indirect potable reuse) by: i) the development of an overarching evaluation and monitoring scheme for IPR processes including sound analytical and modelling approaches, toxicological assessment and public health-relevant microbiological parameters; ii) design and testing of reliable and cost-effective treatment strategies and novel treatment approaches; iii) providing water utilities and agencies, as well as regional, national and EU authorities, with a meaningful and reliable decision support tool for future investments and implementations. To apply comprehensive monitoring strategies, analytical methods for a suite of chemical, biological and toxicological parameters have been developed. For the analysis of CECs

(Contaminants of Emerging Concern) these include several multi-residue, sensitive mass-spectrometry-based analytical methods for the determination of several individual CECs as well as methods for the detection/identification of unknown contaminants (non-target methods). The application of advanced treatment options in a multiple-barrier approach is applied at laboratory and full-scale to test novel and effective treatment options, specifically to improve the removal of CECs, inactivation of pathogens and improvement of other health-related parameters. Detailed fate studies into CECs during water treatment processes are used to unravel the transformation to previously unknown transformation products (TPs). Antibiotic-resistance evaluation will be also included. Bioassays and Biomarkers in course of development will assess the toxicity of the chemical mixtures and unknown compounds. Modelling tools are implemented in the context of Frame to test the performance of novel treatment combinations and are coupled with transport modelling tools to describe the fate of CECs and pathogens in different IPR scenarios. The information gained from experiments and modelling is made accessible via Decision Support Tools, which allow decision makers to estimate IPR performance based on modelling results. The Decision Support Tools are part of a wider communication and decision support strategy to provide guidance for regulation and compliance needs. An assessment and management guidance and a specific handbook for the stakeholders will be also delivered in the context of the project.

Related, the COST-ACTION Nereus ES1403 (New and Emerging Chal-

lenges and Opportunities in Wastewater Reuse) <http://www.nereus-cost.eu/> is a multi-disciplinary network that intended to determine which of the current challenges related to wastewater reuse are the most concerning for public health and environmental protection, and how these can be overcome. Nereus it is the largest Cost-Action of European Union, it has 31 COST Countries, four neighbours countries and five international partner countries and a Total Number of 371 members and is coordinated by the University of Cyprus. The WG include different arguments: Microbiome and mobile antibiotic resistance, uptake and translocations of microcontaminants, effect-based bioassays, wastewater treatment technologies, risk assessment, and policy development.

The relationship between climate, other environmental changes and citizens well-being has been acknowledged in the Horizon 2020 Project "BlueHealth" <https://bluehealth2020.eu/> linking Environment, Health and Climate for Inter-sector Health Promotion and Disease Prevention in a Rapidly Changing Environment" (Call Horizon 2020 research and innovation programme Grant agreement No 666773- Duration: 2016-2020). This project is coordinated by University of Exeter with the collaboration of 9 Partners; BlueHealth aims to understand the effects on health and well-being of exposure to urban blue space in various geographical, climatic, socioeconomic and cultural contexts across Europe, through a multidisciplinary approach based on environmental psychology, ecosystems management, epidemiology, toxicology, landscape and urban planning and design, climate change

modelling, social geography, virtual reality, microbiology, health and environmental economics. BlueHealth will also develop key inputs into policymaking and land/water-use planning towards a sustainable use of the blue space.

The International approach

International financing institutions and intergovernmental agencies also play an important role in supporting research on environment, ecosystems, and health. The World Health Organization, Convention on Biological Diversity, World Organization for Animal Health, Food and Agriculture Organization, and World Bank each have discrete programs that address environmental health, climate change and health, One Health, or Ecohealth. The connections are sometimes even included in international frameworks and conventions. For example, health was formally included in the Paris Climate Agreement of 2016. The UN Convention on Biological Diversity formally established a joint work program on biodiversity and health with the World Health Organization in 2012 leading to two comprehensive decisions on biodiversity and health in 2014 and 2016. The World Health Assembly presented a resolution on climate change and health in 2008. And the Montreal Protocol to protect the ozone layer (and human health) came into effect in 1989. Diving more deeply into one organization gives a sense of the nuanced approach needed to address this constellation of related issues within a bureaucracy.

Taking the World Bank as an exemplar, the three 'fields' of climate change and health, environmental health, and one health have been

segregated to fit within the structure of the institution, so that subtopics within each field can most closely align with the hosting department's agenda. Environmental health is embedded within the Environment department and tends to focus on (though is not exclusive to) pollution and waste management and ecosystems and health; One Health is based in the Agriculture department has an emerging focus on disease threats at the animal-human health interface; and climate change and health is embedded within the Climate department, focusing on the population health risks and opportunities associated with climate change. The Health department is central to each effort as well, though (in)formal coordinating efforts lie with the each of the other sectors. Specialized work is unique to each silo, yet understanding the interactions amongst each is important for work-planning and optimizing shared knowledge. For example, many of the air pollutants that cause climate change also result in negative respiratory health impacts; as climate change is hastened, various vectors of disease, such as mosquitoes and tsetse flies may shift, thus increasing the risk of certain diseases to both humans and animals. The environmental health dimension of this work may focus on air pollution, one health would focus on animal-human disease transmission, and climate health may consider either or both together to develop strategic policy interventions. And so, it becomes clear that while one group or department must take the lead for purposes of efficiency and delivery, the issues and approach are necessarily multisectoral. Diving down even further, focusing from one institution to one department reveals the breadth of

work that can be accomplished with this siloed, yet inclusive and considerate approach. Over the past three years, the World Bank Climate department (<http://www.worldbank.org/en/topic/climatechange>) has established the first major program at any international financing institution, addressing climate change and health. The program was built with intentions that specifically addressed World Bank lending, but also serve the broader international environmental health community. The first step was to identify those with the greatest degree of climate change-associated health impact, drawing upon established indices of climate impact and vulnerability to reveal countries at high risk- both in terms of health impacts associated with carbon co-pollutants, such as cardiovascular and respiratory disease, as well as health impacts caused by climate change, like infectious disease, malnutrition, and heat stress. Findings are presented in *Geographic Hotspots for World Bank Action on Climate Change and Health* and point to critical areas in South-East Asia and sub-Saharan Africa. Next it was necessary to undertake a new analysis of climate connections to the health sector, uncovering an enormous opportunity both for the World Bank portfolio and for others designing and operating health systems. This new report [16], *Climate-Smart Healthcare: Low Carbon and Resilience Opportunities for the Health Sector*, links climate change, the health investment, and development. It describes in-depth approaches for building and sustaining health systems that are prepared for climate change and provides tools and resources to help practitioners turn this knowledge into action.

Conclusions

There is considerable need to improve the protection of human health through the investigation, analysis and assessment of the alterations of the ecosystems. The development of efficient, sensitive, rapid and inexpensive tools for monitoring the ecosystems and the detection and assessment of emerging issues should facilitate the control and prevention of diseases caused by pathogens, toxins, or the chemical substances. This approach is strongly recommended by the EU strategic research agenda (e.g. Horizon 2020) and by the UNEP Sustainable Development Goals. The research and policy international experiences described in this paper are examples of science-policies good practices that should be spread at national and local level to better understand and to fight the effects of the global environmental changes. International financing institutions and intergovernmental agencies, also will have a role to play if more sustainable and inclusive solutions are to be achieved that integrate environment, ecosystems and health.

Acknowledgments

The authors would like to thank the COST Action ES1403 NEREUS “New and emerging challenges and opportunities in wastewater reuse”, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology, www.cost.eu)” and the EU Projects μ AQUA, FRAME, INTCATCH, BlueHealth and all Consortium Partners. We thank Eugenia Dogliotti for the precious review of the manuscript.

For further information:
mario.carere@iss.it

REFERENCES

1. UNEP. Annual Report 2015. ISBN: 978-92-807-3518-5. 2016
2. Wolf, T. and Menne, B. 2007. Environment and health risks from climate change and variability in Italy, http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0007/95920/E90707.pdf, accessed 31 July 2017
3. Directive 2000/60/CE of European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. OJ L.327,200 (http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/index_en.html) (accessed 31 July 2017)
4. European Union, Directive 2013/39/EU of the European parliament and of the council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Official Journal of the European Union*, 2013
5. Decision, E., 495/2015, Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy pursuant to Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council. *Off. J. Eur. Union L*, 2015. 78: p. 40-42
6. Marcheggiani, S.; D'Ugo, E.; Puccinelli, C.; Giuseppetti, R.; D'Angelo, A.M.; Gualerzi, C.O.; Spurio, R.; Medlin, L.K.; Guillebault, D.; Baudart-Lenfant, J.; et al. Detection of emerging and re-emerging pathogens in surface waters close to an urban area. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2015, 12, 5505–5527
7. Tryland, I.; Eregno, F.E.; Braathen, H.; Khalaf, G.; Sjølander, I.; Fossum, M. On-line monitoring of Escherichia coli in raw water at oset drinking water treatment plant, Oslo (Norway). *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2015, 12, 1788–1802
8. Marcheggiani S, Spurio R, Cimarelli L, Tito D, Mancini L. Editorial Scientific Symposium “Small Solution for Big Water-Related Problems: Innovative Microarrays and Small Sensors to Cope with Water Quality and Food Security, *Int. J. Environ. Res Public Health*, 12 (2015) b, pp. 15400-15408
9. Carere M, Polesello S, Kase R, Gawlik B. M. The emerging contaminants in the context of the EU Water Framework Directive. In *The handbook of environmental chemistry - Emerging Contaminants in river ecosystems*. Doi 10.1007/698_2015_5011. ISSN. 1867-979X. Springer Berlin Heidelberg
10. Carere, M., et al., Chemical monitoring and emerging pollutants in the Common Implementation Strategy of the Water Framework Directive. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2012. 36: p. 12-14
11. Brack W., et al., Towards the review of the European Union Water Framework Directive: Recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources. *Science of the Total Environment*, 2017. 576: p. 720-737
12. Wernersson, A.-S. et al., The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe*, 2015. 27(1): p. 1-11
13. EC (2016) Guidelines on integrating water reuse into water planning and management in the context of the WFD. Guidance Document 2016
14. JRC (2014) *Water Reuse in Europe. Relevant guidelines, needs for and barriers to innovation. A synoptic overview*. Joint Research Centre, European Commission Publications Office of the European Union. ISBN 978-92-79-44399-2
15. World Bank Group. *Climate-Smart Healthcare: Low Carbon and Resilience Opportunities for the Health Sector*. 2017

SITOGRAPHY

Report Review of methods for the rapid identification of pathogens in water samples

<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC92395/lbna26881enn.pdf> (accessed 31 July 2017)

EU Project INTCATCH - *Development and application of Novel, Integrated Tools for monitoring and managing Catchments* . <http://intcatch.eu/> (accessed 31 July 2017)

EU Project μ AQUA—Universal microarrays for the evaluation of fresh-water quality based on detection of pathogens and their toxins . Project . http://cordis.europa.eu/project/rcn/99122_en.html (accessed 31 July 2017)

EDA-Emerge ITN-FP 7 <http://www.ufz.de/eda-emerge/> (accessed 31 July 2017)

The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. <https://link.springer.com/article/10.1186/s12302-015-0039-4> (accessed 31 July 2017)

EU Project FRAME (A novel framework to assess and manage contaminants of emerging concern in indirect potable reuse) <http://www.frame-project.eu/> (accessed 31 July 2017)

EU Project COST-ACTION Nereus ES1403 (New and Emerging Challenges and Opportunities in Wastewater Reuse) <http://www.nereus-cost.eu/> (accessed 31 July 2017)

EU Project BlueHealth” linking Up Environment, Health and Climate for Inter-sector Health Promotion and Disease Prevention in a Rapidly Changing Environment” <https://bluehealth2020.eu/> (accessed 31 July 2017)

Giovanni Leonardi

*Direttore generale Ricerca
e Innovazione in sanità,
Ministero della Salute*



Eugenio Aringhieri

*Chief Executive Officer Dompé
Farmaceutici SpA*

.....
Punto & Contropunto è mediata da una tradizione anglosassone. In molte riviste, ma anche in testi divulgativi, si mettono a confronto sullo stesso argomento le opinioni di personalità provenienti da approcci empirici e culturali differenti. Anche la nostra rivista intende proporre questa modalità
.....

Come in quasi tutti i settori della scienza e della tecnologia esiste nei Paesi occidentali un “dualismo” tra ricerca pubblica, in genere definita di base, e quella privata, in generale rivolta all’acquisizione di quote di mercato. Nel campo della salute, considerato il forte valore morale, vi sono possibilità che questa suddivisione trovi una possibilità di comunanza di interessi?

L: Ricerca pubblica e ricerca privata trovano un forte punto di convergenza laddove sono finalizzate all’obiettivo di dare risposte ai bisogni dei cittadini. Tale coincidenza di interessi e obiettivi si manifesta con particolare evidenza nel settore sanitario, in cui obiettivo fondamentale è il miglioramento dell’assistenza, delle cure e dei servizi, con l’obiettivo finale di migliorare la salute dei cittadini e la loro aspettativa e qualità di vita.

Il progresso delle nostre conoscenze su aspetti importanti delle diverse condizioni patologiche e lo sviluppo di opzioni di diagnosi e trattamento innovativi rappresentano strategie chiave per rispondere ai temi della sostenibilità dei servizi sanitari, chiamati a rispondere alle sfide del trend demografico. In effetti, le sfide che la ricerca italiana si trova ad affrontare richiedono una forte capacità di capitalizzare la collaborazione tra industria, PMI

e mondo della ricerca; indubbiamente, il nostro Paese ha perso terreno nella capacità di trasferimento tecnologico, ma l’*open innovation* costituisce una nuova modalità di operare, che può farci recuperare terreno.

A tal fine i Cluster Tecnologici Nazionali, promossi dal Ministero della Ricerca con lo scopo di generare piattaforme di dialogo permanente tra sistema pubblico della ricerca e imprese, rappresentano un’importante infrastruttura intermedia cui sono demandati i compiti di favorire la cooperazione della ricerca pubblica e quella privata e di favorire la specializzazione intelligente dei territori. ALISEI (Advanced Life Science in Italy), in particolare, è dedicato alle Scienze della Vita promuovendo l’interazione tra il sistema della ricerca, il tessuto industriale e le istituzioni pubbliche in un settore in rapida evoluzione in Italia e nel mondo e nel quale la ricerca scientifica procede a un ritmo molto elevato e nuove scoperte e nuovi farmaci vengono immessi sul mercato.

A: Direi che si tratta di una dicotomia che appartiene a un vecchio modo di concepire la ricerca scientifica. Oggi la parola d’ordine della ricerca è network: network di eccellenze e di competenze specialistiche. La ricerca collaborativa – l’*open-network research* – non è un’aspi-



razione, è una realtà concreta che sperimento quotidianamente grazie al mio lavoro. A livello mondiale stiamo vivendo una vera e propria rivoluzione industriale: dei processi, che sono diversi da quelli di dieci anni fa; dei sistemi, che adesso sono sempre più integrati; delle opportunità, ma anche delle sfide, che non si rifanno più ai vecchi e superati confini geografici. Trend che necessariamente hanno avuto impatto anche sul mondo della salute. Un settore che io definisco spesso 'anticiclico', in quanto anticipa i cambiamenti e le evoluzioni e non li subisce. Per questo serve uno spirito innovativo continuo, capace di intercettare dove si andrà prima ancora che la rotta sia tracciata.

Tra i fenomeni che ci vedono interessati, da una parte c'è il forte sviluppo tecnologico: è cambiata la cassetta degli attrezzi, ci siamo specializzati sulle terapie target e avanzate e sul biotech. Questo ha permesso una rivoluzione copernicana: da un'industria chimica a un'industria biotecnologica che va di pari passo con le maggiori innovazioni in campo *hi-tech*. Il futuro del nostro settore si fa con raccolta dei dati – non è un caso che uno dei trend di maggior successo sia rappresentato dai *wearable devices* e dalla *mHealth* – e l'analisi degli stessi (i cosiddetti *big data*).

Oggi un dato di fatto è che si vive di più: grazie ai pro-

gressi in Ricerca&Sviluppo si è riusciti ad allungare l'aspettativa di vita di un mese ogni 4 mesi, cioè sei ore al giorno, cioè tre mesi all'anno. L'aspettativa di vita media dei nostri figli è aumentata rispetto alla nostra, e ciò ci pone davanti alla necessità di trovare risposte a nuove esigenze terapeutiche che prima non esistevano e a cui bisogna rispondere in fretta e bene.

E qui entrano in gioco i concetti di focalizzazione e rete, necessari per chi oggi vuole essere un *player* di riferimento nel mondo delle *life sciences*. Concetti che esulano dal dualismo tra pubblico e privato che rappresenta a mio parere ormai un concetto superato. Più che di dualismo parlerei di integrazione tra sistemi.

L'Italia dal quinto posto nel mercato farmaceutico mondiale nel 2005 scenderà, almeno secondo le previsioni, al settimo nel 2017. Quali sono le cause di questo trend negativo?

A vostro parere le soluzioni e i prodotti dell'industria farmaceutica in Italia possono essere definiti innovativi se confrontati al sistema europeo e a quello più generale dei Paesi con una diversa relazione tra accademia/ricerca pubblica e sistema industriale?

L: Lascio la parola ad Aringhieri.

A: Io non parlerei di prodotti quanto più di vantaggio competitivo generato dal nostro sistema.

I governi che si sono succeduti, in questi ultimi tempi, stanno facendo molto per tenere fede a un modello di sviluppo del Sistema Paese che si basi anche su direttrici chiare: innovazione, digitalizzazione e connessione.

Il nostro Paese attrae investimenti anche e soprattutto perché è in grado di pensare e attuare i sistemi di collaborazione e di innovazione necessari. Ne è un esempio il "Piano Industria 4.0", con il quale ci inseriamo in un filone inaugurato da Paesi altamente innovativi come la Germania, la Francia e gli Stati Uniti, che hanno stanziato fondi cospicui per la trasformazione digitale e l'*open innovation*, o progetti come il *Technopole* nell'area ex Expo.

Ma non vanno dimenticati interventi come il *patent box* e gli investimenti in innovazione di Cassa Depositi e Prestiti.

È anche grazie a misure di questo tipo, e a un indotto che definirei in crescita, che il nostro Paese continua ad essere fortemente innovativo in ambito farmaceutico. Abbiamo una produzione in Europa seconda solo alla Germania, con un valore della nostra industria che supera i 30 miliardi di euro. Ne investiamo 2,5, ma la cosa che è più importante è il dato di export. Anche lo scorso anno siamo cresciuti facendo registrare un 57% di quota di export, rispetto al 23% della media dell'industria.

In Ricerca&Sviluppo oggi, grazie alla *network innovation*, c'è il record di molecole in sviluppo, più di 7.000 nel mondo, e l'Italia guida il trend grazie agli investimenti in ricerca e innovazione.

Penso in primo luogo al *biotech*, dove in Europa deteniamo il secondo posto per numero di imprese innovative. Oggi nella pipeline di ricerca italiana sono presenti circa 350 farmaci e oltre 200 sono già disponibili. tre terapie avanzate su sei in Europa sono italiane.

Mi sembra un risultato di cui andare fieri, frutto anche della collaborazione tra ricerca pubblica e privata. In quest'ottica gli spin-off universitari sono esempi virtuosi che dimostrano che, quando un'idea è forte e c'è un *buon piano di strategico*, il mercato sa riconoscerlo.

Quali sono i problemi delle PMI/start up nazionali, apparentemente timide nell'investire in R&S con gli EPR?

L: Il modo di generare innovazione ha subito e sta subendo un profondo mutamento anche in considerazione della crescente necessità di integrare tecnologie e competenze di natura diversa: il processo innovativo tende sempre più a svilupparsi in rete, integrando le capacità innovativa di PMI, *start-up*, centri di ricerca pubblici e privati, e passando dalla R&S chiusa all'*open innovation*. Tale percorso richiede al mondo della ricerca di abbattere gli ostacoli, culturali e di sistema per incrementare l'interazione con attori non appartenenti al mondo

della ricerca, in primo luogo il mondo delle imprese. Trasformare i risultati della ricerca in impresa è un percorso reso difficile dalla difficoltà di accedere a finanziamenti in grado di sostenerne lo sviluppo, a partire dalle fasi dei *seed capital*, dalla lunga tempistica *from the lab to market* e, non ultimo, dall'alto rischio intrinseco della ricerca scientifica, in cui non è mai chiaro in partenza se e quanto sarà il ritorno sulle risorse impiegate. Occorre poi considerare che nel settore sanitario il trasferimento tecnologico richiede una delicata fase di sperimentazione con regole stringenti e tempi medio lunghi. Le difficoltà, pertanto, oggettivamente esistono, ma, d'altra parte, gli esempi di successo dimostrano che investire è possibile. La crescente attenzione dei fondi di investi-



mento, oltre alle iniziative di sostegno agli investimenti, dovrebbero poi aiutare le PMI a scommettere sull'innovazione in sanità.

A: Credo che, per ragion d'essere, una *start up* sia portatrice di una cultura innovativa e l'apertura verso questo tipo di *mindset* sta a mio parere cambiando. Dati recenti ci restituiscono che nel primo trimestre del 2017 sono state registrate circa 40 operazioni di investimento da venture capital, finanziamenti privati ed *equity crowdfunding* in startup italiane (e fondate da italiani)¹. Molto si sta facendo anche nel settore *life sciences*: io stes-

so ho fatto parte della commissione dell'Unicredit *Start Lab*, un progetto istituito per la valutazione delle *start up* più meritevoli e innovative in questo ambito.

L'assunto di base da tenere sempre in considerazione è che la condivisione delle conoscenze e la capacità di fare network su scala nazionale ed internazionale, cercando di cogliere i progetti migliori nell'ambito della ricerca e delle *start up* del settore, sono i capisaldi di una strategia di sviluppo per le imprese italiane che operano nel settore delle scienze della vita.

Il tema dell'attrazione degli investimenti è ancora aperto nel nostro Paese. Si può fare di più per aggregare competenze e attrarre risorse attorno a progetti altamente innovativi. Ovviamente esistono ancora margini di miglioramento che tutti insieme dobbiamo cercare di superare attraverso l'interazione con competenze e conoscenze di altri settori affini al nostro, al fine di creare sinergie positive per tutti i partecipanti ai progetti, sia aggregando con maggior costanza e attenzione esperienze e idee progettuali diverse. Penso che la parola chiave di questo impegno debba essere proprio network: solo facendo rete si può arrivare alla condivisione di quel *know how* che può aiutare a far crescere le nostre realtà. Ovviamente a fianco di questo è necessario proseguire nell'attività di collegamento con le Istituzioni e gli altri *stakeholder*, facendo crescere l'innovazione.

Le infrastrutture di ricerca biomedica, sia pubbliche che private, sono poco inclini al trasferimento tecnologico. È vero secondo voi o si tratta di luoghi comuni?

L: In Italia è diventato particolarmente evidente come la ricerca sanitaria produca risultati che non sempre vengono adeguatamente valorizzati per uno scarso orientamento allo sviluppo industriale. A fronte di risultati di eccellenza che collocano il nostro Paese ai vertici per numero pubblicazioni e di citazioni e per produttività della ricerca, il sistema presenta alcune criticità che ostacolano il trasferimento dei risultati della ricerca e, quindi, la creazione di valore, inteso non solo come ritorno economico, ma come capacità di fornire soluzioni innovative

ai pazienti e nuove opportunità di sbocchi professionali ad alto valore aggiunto per i giovani.

Osservo, però, che si sta diffondendo un nuovo atteggiamento culturale: iniziative di coordinamento tra gli EPR (Netval in particolare), i Cluster, le Infrastrutture di ricerca ESFRI, unite al ciclo di programmazione avviato con il Piano Nazionale della Ricerca e la Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente, unite ad un crescente interesse delle imprese per le opportunità offerte dal mondo della ricerca, stanno creando un humus favorevole per una evoluzione verso una maggiore consapevolezza del ruolo che la valorizzazione dei risultati della ricerca può avere per lo sviluppo economico.

A: Il tema del trasferimento tecnologico è il terreno sui cui si giocherà una larga parte del futuro della ricerca scientifica in Italia. È qui che le imprese e il settore pubblico devono incontrarsi con regole definite e un linguaggio comune che permetta loro di intendersi. Dobbiamo dare tempo al sistema di adeguarsi al nuovo scenario competitivo anche se il tempo è prezioso quando parliamo di processi in atto a livello globale. Sono certo però che un progetto come *Human Technopole* sarà un fortissimo acceleratore per tutto il sistema della ricerca italiana. Così come ritengo che la candidatura di Milano quale nuova sede dell'Agenzia europea del farmaco (EMA) abbia già prodotto un primo importante risultato: quello di prendere maggiormente coscienza delle competenze che già oggi può mettere in campo il settore farmaceutico e di quale possa essere il suo ruolo in uno scenario internazionale.

Sicuramente la frammentazione del sistema economico nazionale è da un lato un limite ma è anche la ragione per la quale il livello di resilienza del settore industriale è alto. E qui si inserisce bene il ruolo dei cluster nazionali che sono una buona risposta per affrontare i cambiamenti in atto e le nuove esigenze.

Penso al *Cluster Alisei* ad esempio, che rappresenta uno dei *cluster* nazionali deputati a sviluppare strategie di sviluppo in rete tra mondo della ricerca, delle imprese e delle Istituzioni. In questo senso sono state proposte

iniziative sia per migliorare le risposte del Sistema Italia in questo ambito, sia di tipo trasversale, in grado di favorire non solo un'analisi delle opportunità per il nostro Paese ma anche un miglior posizionamento di Alisei e dell'innovazione italiana nell'ambito della salute sui mercati internazionali.

Gli obiettivi del piano strategico sono tanti: dalla promozione del dialogo tra diversi attori alla creazione di un sistema di innovazione territoriale in tutto il Paese, fino all'integrazione della ricerca pubblica e privata con la produzione industriale e alla promozione della ricerca, del trasferimento tecnologico, e degli incubatori. L'obiettivo è contribuire allo sviluppo di un'industria innovativa nel settore delle scienze della vita in grado di competere a livello nazionale e internazionale.

Nell'ambito Salute/Scienze della vita quali sono gli strumenti di finanziamento e le reti che ritenete possano essere più efficaci per valorizzare i risultati scientifici, così brillantemente presenti nel panorama internazionale?

L: In linea generale, ritengo che i fondi competitivi garantiscano la migliore allocazione delle risorse, anche se l'insufficienza delle risorse rispetto alle potenziali richieste crea insoddisfazione talvolta anche un senso di frustrazione tra i ricercatori.

Per quanto riguarda il Ministero della Salute, i finanziamenti erogati rappresentano circa il 50% di tutta la ricerca competitiva finanziata dal sistema pubblico nazionale e circa il 17% di tutta la spesa nazionale di R&S nel settore biomedico. Il Ministero della Salute è la 17° Istituzione finanziatrice della ricerca biomedica a livello mondiale. Le strategie di finanziamento messe in campo si muovono sostanzialmente su due diverse traiettorie: finanziamento della ricerca biomedica condotta dagli enti del Sistema Sanitario Nazionale (SSN) (attraverso il Bando per la Ricerca Finalizzata) e finanziamento della ricerca corrente degli Istituti di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) attraverso meccanismi premiali, basati su criteri predefiniti.

Per quanto riguarda, in particolare, la ricerca finalizzata, ricordo le risorse dedicate ai giovani ricercatori, che nell'ultimo bando ammontano a 54 milioni di euro. Questa sezione del Bando sta permettendo a molti giovani ricercatori di sviluppare le loro idee e creare un percorso di crescita professionale di alto livello. Un'altra sezione del Bando è specificamente dedicata al trasferimento tecnologico. Abbiamo apportato delle modifiche a partire dalla prossima edizione, che dovrebbe rendere il contributo ministeriale più attrattivo per le imprese che intendono impegnarsi nello sviluppo di brevetti detenuti da enti del SSN.

Tra i criteri chiave delle strategie di promozione della ricerca sanitaria, riveste un valore strategico la capacità di operare in rete e di mettere a comune le risorse in termini di competenze scientifiche cliniche, sperimentali e biotecnologiche, di tecnologie avanzate. L'interconnessione ed tra gli attori della ricerca è fortemente promossa e sostenuta dal ministero della salute, a partire dall'aggregazione degli IRCCS nelle 4 Reti tematiche, Alleanza Contro il Cancro (ACC), Rete Neuroscienze e riabilitazione, Rete Cardiologica e Rete Italiana dell'età evolutiva, cui si aggiungerà la rete dedicata ai temi dell'invecchiamento (Italia Longeva).

Reti IRCCS come nuclei di aggregazioni più ampie, nella consapevolezza che fare sistema è condizione necessaria per mantenere ed incrementare il livello qualitativo della ricerca sanitaria condotta nel nostro Paese.

A: Dal punto di vista dell'impresa, a mio avviso la prima leva resta il network. Credo che oggi per un'impresa farmaceutica sia più che mai necessario diventare globale, che non significa necessariamente essere grande ma significa essere capillari. Per la prima volta, oggi, un'azienda grande non sempre è una grande azienda. Penso al settore delle malattie rare, che ci riguarda da vicino, dove la rete e il network sono aspetti molto importanti quando si tratta di piccoli numeri.

Considero fondamentale la diffusione delle informazioni, che nasce proprio dalla strategia di *open innovation*. Il processo di ricerca si deve spingere oltre i confini azien-

dali, per concretizzarsi nella logica della rete: grazie al modello di *open innovation* l'azienda ha modo di stabilire un dialogo costante con attori più variegati, quali centri di ricerca, università, startup, capaci di portare *expertise* e approcci diversi tra loro e, quindi, in grado di rappresentare un fattore critico di successo nella scommessa

all'innovazione. In questo senso è fondamentale il contributo dei cluster nazionali. Alisei ha tra gli obiettivi metodologici proprio quello di consentire una razionalizzazione del trasferimento tecnologico e di migliorare l'efficienza delle strutture di *technology transfer* nelle diverse aziende.

¹ <http://startupitalia.eu/70859-20170331-lista-primi-3-mesi-investimenti-startup-2017>

L'Analisi trimestrale dell'ENEA, uno strumento per la valutazione della transizione energetica italiana

L'*Analisi trimestrale del sistema energetico italiano* è una pubblicazione dell'ENEA che presenta i risultati di un'attività sistematica di monitoraggio e analisi degli elementi che contraddistinguono l'evoluzione del sistema energetico italiano, con riferimento in particolare alle sfide che caratterizzano la transizione energetica. L'*Analisi* intende fornire un contributo informativo alla comunità scientifica, ai decisori e al mondo dell'industria

DOI 10.12910/EAI2017-058

di **Francesco Graceva, Elena De Luca e Andrea Fianza, ENEA**

L'attuale fase di transizione del sistema energetico italiano e europeo è caratterizzata da un ampio spettro di sfide e potenziali criticità, legate agli ambiziosi obiettivi di politica energetica e ambientale e ai continui cambiamenti della regolazione dei mercati. D'altra parte, nel settore energetico le decisioni richiedono una prospettiva di lungo-periodo e dovrebbero essere basate su una conoscenza approfondita e 'diffusa' delle questioni e su analisi rigorose, trasparenti e indipendenti. Un'atti-

vità di analisi del sistema energetico sarà inoltre obbligatoria per gli Stati membri dell'Unione Europea per la redazione dei Piani Nazionali Energia e Clima previsti nell'ambito della *Energy Union*.

Le informazioni sul settore energetico, soprattutto a livello internazionale, sono però spesso frammentarie e disomogenee; ciò in quanto i dati, quando disponibili, sono raccolti e forniti da differenti soggetti con una cadenza temporale non sempre costante. In particolare, per quanto riguarda il sistema energetico italiano,

sebbene non manchino sia alcune *survey* di agenzie internazionali sia autorevoli pubblicazioni periodiche di fonte governativa, nella pubblicistica specialistica esistono solo analisi periodiche prodotte da entità non indipendenti e con accessibilità limitata o condizionata.

L'Unità Studi e Strategie dell'ENEA¹ ha iniziato un'attività di monitoraggio e di analisi anche con l'obiettivo di colmare le lacune suddette. L'"Analisi trimestrale del sistema energetico italiano" (<http://www.enea.it/it/seguici/pubblicazioni/analisi->

trimestrale-del-sistema-energetico-italiano) vuole infatti caratterizzarsi per l'uso di una metodologia rigorosa e trasparente che utilizza dati di pubblico accesso. Iniziata nel 2016, la pubblicazione ha ottenuto una rilevante visibilità nel campo della stampa nazionale specialistica e generalista.

Le tre componenti principali del sistema energetico

L'Analisi trimestrale esamina l'evoluzione del sistema energetico italiano nel corso dell'ultimo trimestre, a partire dalla stima anticipata dei consumi di energia primaria e finale, inquadrando i dati all'interno di un orizzonte temporale di lungo periodo.

L'oggetto di studio, ovvero il sistema

energetico italiano, viene analizzato considerando le tre dimensioni principali della politica energetica - decarbonizzazione, sicurezza energetica e prezzo dell'energia - definite nel loro insieme "trilemma energetico". Poiché tali dimensioni sono tra loro correlate, è di notevole interesse valutare la possibilità che tra loro vi siano dei *trade-off*, con miglioramenti su una dimensione del sistema compensati da peggioramenti sulle altre. A tal fine, l'Analisi trimestrale è costruita intorno a un ampio set di indicatori in grado di cogliere i diversi aspetti di ciascuna delle tre dimensioni suddette, indicatori che sono poi sintetizzati nell'Indice Sicurezza energetica, PPrezzo Energia e Decarbonizzazione (ISPRED), costruito per fornire una misura quantitativa dello

stato del sistema energetico italiano. Riguardo alla decarbonizzazione, è innanzi tutto essenziale osservare l'evoluzione nel tempo delle emissioni di CO₂ del sistema energetico italiano, distinguendo tra le emissioni di CO₂ dei settori Emissions Trading System (ETS), cioè le emissioni provenienti dall'industria energivora e dalla generazione elettrica, e le emissioni dei settori rientranti nella Effort Sharing Decision (ESD), cioè le emissioni legate prevalentemente ai trasporti e alla climatizzazione degli edifici. Ne emerge che la traiettoria delle emissioni ETS è in linea con gli obiettivi, mentre sembra molto più incerto il raggiungimento degli obiettivi relativi alle emissioni ESD.

In effetti, distinguendo il contributo relativo dei principali driver che



influenzano il livello di emissioni (cioè popolazione, PIL, intensità energetica, quota di fonti fossili, intensità carbonica delle fonti fossili) si evidenzia come in Italia, negli ultimi anni, la forte diminuzione delle emissioni di CO₂ sia avvenuta, più che in altri Paesi, per la diminuzione dell'attività economica, mentre i fattori strutturali hanno svolto un ruolo più ridotto. Tra questi, si segnalano il rallentamento dello sviluppo delle fonti rinnovabili e i lenti cambiamenti del parco auto circolante.

Riguardo alla sicurezza del sistema energetico nazionale, è essenziale che l'analisi parta dal riconoscimento dell'intrinseca complessità della questione, che include una pluralità di mercati (petrolio, gas, elettricità), di segmenti della *supply chain* (*upstream*, *midstream*, *downstream*) e diversi orizzonti temporali. Nel sistema petrolifero la situazione italiana è abbastanza rassicurante per l'approvvigionamento di greggio e la disponibilità di prodotti petroliferi, mentre resta necessario prestare attenzione alla competitività della raffinazione, che dopo la ripresa degli ultimi anni, nel 2016 ha visto di nuovo peggiorare sia i margini sia l'utilizzo degli impianti. Nel sistema del gas naturale restano su livelli meritevoli di attenzione diverse delle questioni sollevate dalla Strategia Energetica Nazionale (SEN) del 2013, non a caso ribadite nella SEN del 2017: l'adeguatezza del sistema rispetto a possibili situazioni estreme a fine inverno e il mancato allineamento dei prezzi italiani con quelli degli hub continentali. Nel mercato elettrico la tendenza degli ultimi anni alla crescita della penetrazione delle Fonti Rinnovabili Non Programmabili (FRNP) ha portato a un peggioramento di diversi indicatori

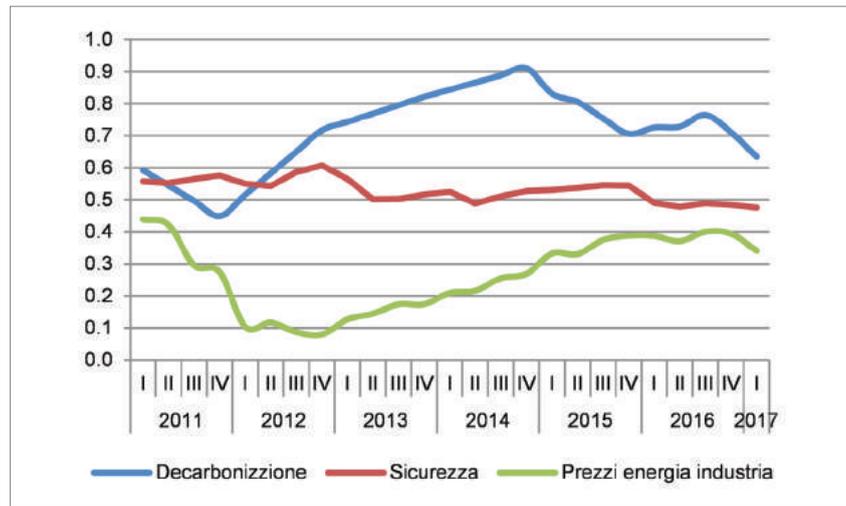


Fig. 1 Evoluzione temporale degli indici sintetici relativi alle tre dimensioni della politica energetica

Fonte: ENEA

rappresentativi della complessità di gestione delle FRNP; inoltre, nonostante la domanda debole, l'eccesso di capacità è stato significativamente riassorbito, al punto da far riemergere nuove preoccupazioni, in particolare riguardo alla disponibilità di sufficiente capacità flessibile.

Riguardo ai prezzi dell'energia per il sistema industriale, nel confronto con le altre realtà europee restano elevati in particolare quelli dell'energia elettrica, i cui indicatori, pur migliorati negli ultimi due anni, si mantengono su valori di elevata criticità, in primo luogo per il peso della fiscalità. Nel caso del gas naturale è invece notevole il divario dei prezzi tra piccole e grandi utenze, con le prime che pagano il gas molto al di sopra della media europea. I prezzi del gasolio sono tra i più alti d'Europa per l'incidenza della tassazione.

Nell'Analisi trimestrale, infine, sono anche presentati i risultati di un lavoro di catalogazione degli articoli relativi alle tematiche energetiche usciti nella principale stampa

generalista italiana. Ne emerge che su quest'ultima molti dei temi di rilievo su evidenziati faticano a trovare spazio.

L'indice ISPRED

Nella letteratura scientifica è frequente l'uso di indicatori composti per analizzare in modo quantitativo i diversi aspetti del sistema energetico, con particolare riferimento al tema della sicurezza energetica. Non esistono però ancora metodologie consolidate per l'analisi e la valutazione complessiva dei diversi aspetti del sistema energetico, riassunti nel cosiddetto 'trilemma' energetico. Un esempio di rilievo è l'*Energy Trilemma Index* (World Energy Council, 2016) [1], che produce una classifica dei paesi sulla base della loro capacità di fornire energia sostenibile nelle tre dimensioni di

- *Energy security*
- *Energy equity (accessibility and affordability)*
- *Environmental sustainability.*

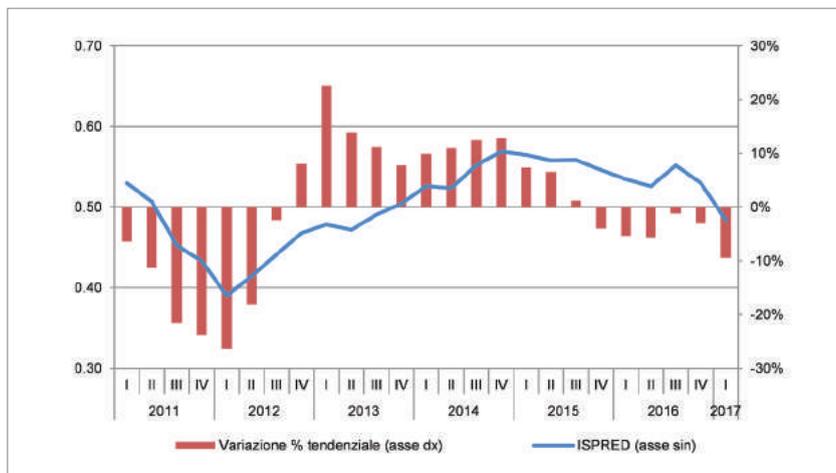


Fig. 2 Indice Sicurezza energetica, Prezzo Energia e Decarbonizzazione – ISPRE (valori annuali - asse sn - e variazioni percentuali sull'anno precedente - asse dx)

Fonte: ENEA

Un altro riferimento importante è il set di indicatori recentemente proposto dalla Commissione Europea per la valutazione dello stato dei sistemi energetici europei nell'ambito dell'Energy Union (European Commission, 2017) [2].

L'indice ISPRE, basato su 27 indicatori, sintetizza i risultati delle analisi relative alle tre dimensioni del trilemma energetico. Dalla combinazione degli indicatori attraverso la media pesata, con pesi assegnati secondo il giudizio degli esperti (B.W. Ang, W.L. Choong, T.S. Ng, 2015) [3], si produce una misura quantitativa dello stato di ciascuna delle tre dimensioni. La combinazione dei valori ottenuti per ciascuna delle tre dimensioni, basata sull'ipotesi che le tre dimensioni hanno pari importanza nel trilemma energetico, dunque peso uguale, porta al calcolo dell'ISPRE. L'ISPRE può variare tra i due estremi di 0 e 1. La dimensione *decarbonizzazione* è valutata rispetto agli obiettivi di emissione di CO₂, attraverso delle proiezioni che riguardano in particolare il settore ESD, e di sviluppo

delle fonti energetiche rinnovabili.

La dimensione *sicurezza energetica* è valutata considerando i tre mercati descritti precedentemente, con indicatori in grado di rappresentare aspetti come il rischio, la resilienza, la flessibilità e l'adeguatezza del mercato del petrolio e dei prodotti petroliferi, la competitività della raffinazione, la resilienza e l'adeguatezza del sistema del gas naturale, l'adeguatezza e la flessibilità del sistema elettrico.

La dimensione *prezzo* dell'energia

per l'industria è valutata mediante il confronto fra i prezzi dell'energia elettrica e del gas naturale pagati dalle imprese italiane, nelle diverse fasce di consumo, e i prezzi che si registrano sugli altri mercati europei, al netto delle imposte recuperabili. Nel caso del gasolio viene invece confrontato il prezzo agli utenti finali.

Evoluzione temporale dell'ISPRE: applicazione dal 2011 ad oggi

In Figura 1 è riportato l'andamento, su base trimestrale, degli indici relativi alle tre dimensioni del sistema energetico per il periodo 2011-2017. Il grafico evidenzia alcune caratteristiche salienti della traiettoria seguita negli ultimi anni. Una prima considerazione che se ne trae è che le tre dimensioni non sembrano essere correlate positivamente, cioè non hanno andamenti paralleli, lasciando intendere la possibile esistenza di *trade-off* tra le stesse. In particolare, per la sicurezza energetica si evidenzia una tendenza di medio periodo alla diminuzione dell'indice relativo, sebbene sempre all'interno della fascia di criticità media. Il percorso di decarbonizzazione del sistema

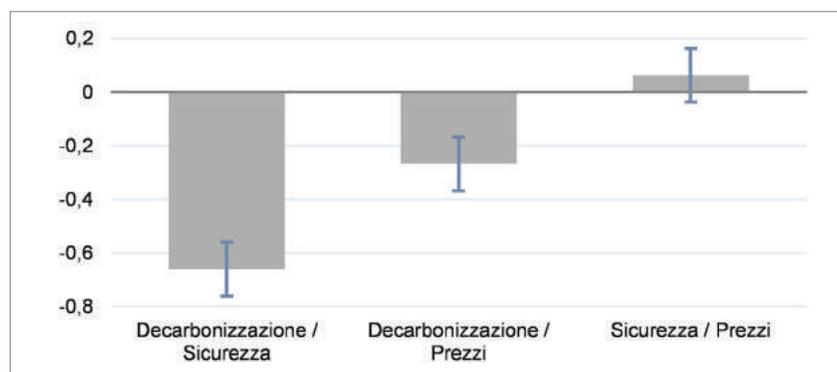


Fig. 3 Coefficienti di correlazione tra le tre dimensioni del trilemma energetico e relativo intervallo di confidenza

Fonte: ENEA

ha invece presentato costanti e forti progressi tra il 2011 e il 2014, ma negli ultimi due anni appare in peggioramento, a causa delle variazioni relative ai mercati del gas e dell'elettricità. I prezzi dell'energia per l'industria presentano invece un trend parzialmente opposto a quello della decarbonizzazione: in deciso peggioramento fino al 2012-2013, poi in costante ripresa, grazie in particolare al miglioramento sui prezzi dell'elettricità.

Mediante l'aggregazione degli indici sintetici relativi alle tre dimensioni si ottiene l'ISPRED che fornisce una valutazione sintetica dello stato corrente del sistema energetico, attraverso la serie storica, della sua evoluzione nel tempo. La Figura 2 mostra come nell'arco temporale considerato si sia assistito dapprima a un calo dell'indice (tra il 2011 e il 2012), fino a valori ampiamente al di sotto della soglia di 0,5, poi a una ripresa nei due anni successivi, quando c'è stato un miglioramento parallelo di decarbonizzazione e prezzi dell'energia. Negli ultimi due anni la combinazione delle tre dimensioni ha portato invece a un leggero calo dell'ISPRED che all'inizio del 2017 è di nuovo sceso al di sotto della soglia 0,5, indicando che il sistema energetico italiano sembra procedere lungo una traiettoria di soddisfacimento 'parziale' del trilemma energetico.

Per una misura delle relazioni esistenti tra le tre dimensioni della politica energetica è interessante analizzare le correlazioni fra gli indici relativi a ciascuna di esse (Figura 3).

Tale analisi evidenzia che negli ultimi sei anni vi è stata una significativa correlazione negativa tra decarbonizzazione e sicurezza energetica, mentre la correlazione fra decarbonizzazione e prezzi è stata anch'essa negativa ma meno significativa. Nel primo caso sembra quindi emergere un *trade-off* tra le due componenti, legato in particolare all'impatto dell'incremento delle fonti energetiche rinnovabili sulla sicurezza del sistema elettrico. Nel caso della relazione tra decarbonizzazione e prezzi dell'energia il segno negativo si spiega invece con i costi sostenuti per l'incentivazione delle fonti rinnovabili, che hanno determinato un significativo aumento dei costi dell'energia elettrica (riflessi nella componente oneri di sistema). Non emerge invece una correlazione significativa fra le dimensioni sicurezza energetica e prezzi dell'energia.

In conclusione, l'indicazione di rilievo che sembra emergere da questa analisi è che la transizione energetica italiana degli ultimi anni si è probabilmente sviluppata in presenza di relazioni di *trade-off* fra le tre dimensioni del trilemma. La riconduzione delle tre dimensioni a un rapporto sinergico sembra evidentemente un obiettivo prioritario per una transizione più efficiente.

Agenda di ricerca

L'Analisi trimestrale costituisce parte integrante di un progetto più ampio che si propone un'attività siste-

matica e continua di monitoraggio del sistema energetico italiano, volta ad analizzare e comprendere la struttura e i meccanismi di funzionamento dei diversi mercati dell'energia su scala nazionale e internazionale, a partire da un'ampia base dati trasparente e costantemente aggiornata, in grado di alimentare una serie di prodotti editoriali diversi. In particolare, per garantire il rigore scientifico delle metodologie utilizzate è considerato di primaria importanza il confronto con la comunità scientifica, da rafforzare mediante la preparazione di articoli scientifici per riviste internazionali *peer-reviewed* e la progressiva estensione della disponibilità della base dati utilizzata nelle analisi.

Con riferimento, inoltre, ai mercati dell'elettricità e del gas naturale, che rappresentano l'oggetto principale degli interventi di *policy* in ambito europeo, è prevista una progressiva maggiore integrazione di questa attività con le attività di ricerca basate sull'utilizzo di modelli quantitativi del sistema energetico, come i modelli TIMES-Italia e PLEXOS-Italia. Il gruppo di lavoro è infine aperto alla formalizzazione e consolidamento di una rete di collaborazione con realtà accademiche, enti di ricerca ed esperti settoriali, a partire da alcune attività in corso con il *Joint Research Centre* della Commissione Europea e con l'Università di Edimburgo.

Per maggiori informazioni
francesco.gracceva@enea.it

¹ Il gruppo di lavoro è costituito da Francesco Gracceva, Elena De Luca, Andrea Fidanza, Paola Del Nero, Laura Gaetana Giuffrida, Bruna Felici, Carlo Pona, Alessandro Zini

BIBLIOGRAFIA

1. World Energy Council World Energy Trilemma Index | 2016
2. European Commission, SWD (2017) 32 final
3. B.W. Ang, W.L. Choong, T.S. Ng, Energy security: Definitions, dimensions and indexes, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42 (2015) 1077–1093

Moda e sostenibilità, tendenze e prospettive future del settore

Le imprese italiane sono chiamate a interpretare le sfide globali della sostenibilità definendo azioni concrete e distintive e cogliendo le opportunità offerte da una maggiore attenzione agli aspetti ambientali e sociali

DOI 10.12910/EAI2017-059

di **Luca Andriola**, *ENEA* e **Michelangelo Bovi**, *Sustainability Consultant*

La crescente attenzione nei confronti della sostenibilità ambientale e sociale dei prodotti e dei processi produttivi e il recente cambiamento dei modelli produttivi, l'espansione dei mercati in una dimensione globale e il crescente desiderio dei consumatori di acquistare a breve termine, ha portato alcuni settori industriali ad una crescita considerevole. Uno dei settori industriali che da anni sta vivendo un forte dinamismo e una forte crescita è sicuramente quello della moda (e del tessile/abbigliamento), e l'Italia, soprattutto negli articoli di lusso, è certamente tra i Paesi maggiormente interessati, sia per il *know-how* che per l'eccellenza dei prodotti venduti in tutto il mondo.

Le dimensioni del mercato tessile statunitense ed europeo sono comparabili, ma l'Europa ha un consumo totale di articoli del tessile/abbigliamento che lo rende il più grande mercato al mondo di questi articoli. In questo scenario l'evoluzione della domanda nel corso degli ultimi venti anni è stata decisamente positiva, evidenziando un tasso di crescita medio annuo del +5,3%.

Nel contempo i clienti/consumatori hanno maturato una maggiore consapevolezza verso le questioni ambientali e sociali che rappresentano un aspetto importante per l'immagine di una azienda e dei propri brand, considerando che molte imprese nel settore della moda utilizzano una catena di fornitura sempre più com-

pressa e articolata. La mancanza di una gestione delle problematiche ambientali e sociali può comportare per le imprese dei rischi che possono incidere sulla reputazione di un'azienda e influire negativamente sui suoi risultati economici.

Le imprese italiane sono pertanto chiamate a interpretare le sfide globali della sostenibilità, definendo azioni concrete e distintive, cogliendo le opportunità offerte da una maggiore attenzione agli aspetti ambientali e sociali e, al contempo, gestendo al meglio i rischi di reputazione, di perdita di quote di mercato e i rischi operativi in una ottica di *Risk Management*. L'obiettivo per le imprese italiane è quello di puntare a una moda sostenibile, attraverso l'adozione di

modelli di gestione responsabile lungo tutta la catena del valore.

Nel settore tessile, l'innovazione tecnologica e la progressiva liberalizzazione dei mercati internazionali ha reso diffusa la pratica di delocalizzare alcune fasi manifatturiere presso fornitori presenti nelle economie emergenti, dove spesso la legislazione ed i controlli in campo ambientale e sociale risultano meno stringenti rispetto a quanto avviene sia in Italia sia in Europa.

Secondo un recente studio del *Nordic Fashion Council*, l'industria della moda rappresenterebbe la seconda industria più inquinante al mondo, seconda solamente a quella petrolifera. Oggi vengono venduti annualmente ottanta miliardi di abiti all'anno, circa il 400% in più rispetto a vent'anni fa.

Tra i brand più importanti finora, protagonisti di questo cambiamento, troviamo le case della moda, cosiddetta *fast fashion* che, puntando sulla quantità talvolta a discapito della qualità della produzione, presentano fino a cinquantadue collezioni all'anno, esercitando una forte pressione sui produttori, i quali sono spesso costretti a subappaltare gli ordini pur di far fronte alle richieste, creando una capillarizzazione della produzione di difficile tracciabilità.

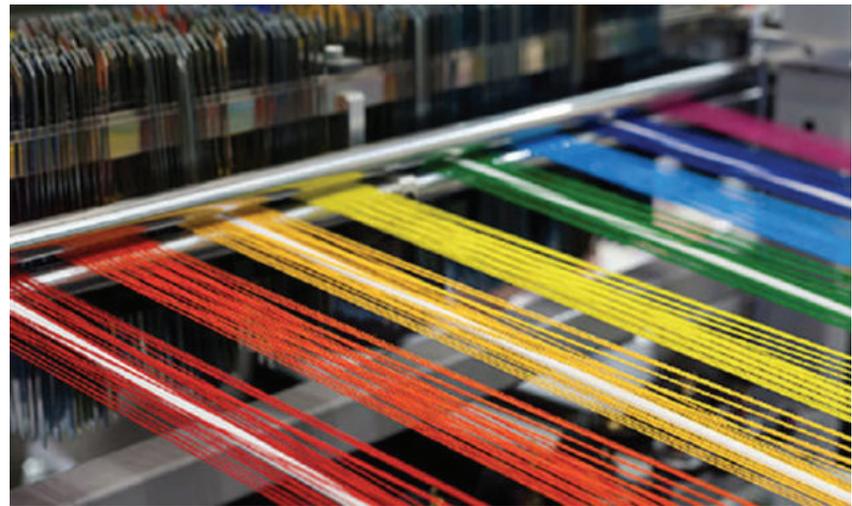
Problematiche ambientali, sociali ed etiche (con particolare attenzione all'utilizzo dei prodotti animali) ultimamente attirano l'attenzione dei clienti/consumatori, dei media e delle ONG (rif. Organizzazioni Non Governative) e richiedono una maggiore trasparenza da parte delle aziende della moda.

Le aziende sono quindi chiamate ad impegnarsi in un percorso di 'sostenibilità nella moda' attraverso l'adozione di modelli di gestione responsabile lungo tutta la catena del valore.

In materia di gestione delle problematiche ambientali, a partire dagli anni 80-90 si sono diffuse forme di assicurazione della qualità rappresentate dalla certificazione di prodotto e dalla certificazione dei sistemi di gestione aziendali (ISO 14001:2015 ed EMAS).

Tra gli standard applicabili e attualmente diffusi nel settore moda, possiamo segnalare:

- lo standard *Oeko-Tex Standard 100* che prende in considerazione le sostanze potenzialmente pericolose che potrebbero essere contenute



nel prodotto finale e quindi venire a contatto con il cliente finale/consumatore¹;

- il 'modello STeP' sviluppato da Oeko-Tex che se pur meno diffuso, offre un'analisi ed una valutazione delle condizioni di produzione ponendo particolare attenzione sull'utilizzo di tecnologie *environmentally friendly* e sui prodotti²;
- lo standard GOTS *Global Organic Textile Standard* garantisce la produzione di prodotti di origine organica assicurando anche gli aspetti

ambientali e sociali attraverso organismi di certificazione indipendenti (in Italia ICEA)³.

A livello sociale, lo standard gestionale più diffuso è rappresentato dal sistema SA8000 (*Social Accountability*), mentre la *Fairtrade Foundation* si occupa di assegnare il proprio marchio a prodotti che abbiano rispettato alcuni specifici requisiti, quali la retribuzione salariale, le condizioni di lavoro ed accordi contrattuali equi con i produttori.

Nel settore della moda è molto diffuso il logo *Fair Cotton* che certifica

la provenienza del cotone⁴; si sta affermando in alternativa un sistema simile, offerto dalla *Better Cotton Initiative* una organizzazione no-profit che si sta impegnando per il miglioramento delle condizioni lavorative nella produzione del cotone⁵.

Un'ulteriore certificazione è rappresentata da *Bluesign*, utilizzata per attestare una produzione sostenibile di tessuti eliminando sostanze potenzialmente pericolose dalle fasi iniziali della catena di produzione, che determina e controlla dei para-

metri per una produzione sicura ed *environmentally friendly*⁶. Una altra tipologia di certificazione, più recente, che da qualche anno si sta diffondendo nel settore è quella denominata C2C *Cradle 2 Cradle*; attraverso un approccio sostenibile a partire dalla progettazione di un prodotto, mira ad una *'economia circolare'*. Per quanto riguarda l'utilizzo di sostanze pericolose, a livello di Regolamenti Europei, il più importante è certamente il Regolamento REACH (CE) n. 1907/2006.

Tali certificazioni e regolamenti sono nati anche in risposta a diverse iniziative compiute dalle ONG, tra cui *Greenpeace*, che ha pubblicato alcuni 'rapporti', in cui criticava diverse aziende di utilizzare sostanze chimiche pericolose, in particolare ricordiamo la campagna *Detox* nel 2011, ed il più recente 'Report', datato gennaio 2016, denominato *'Leaving Traces'* che ha posto l'attenzione su diverse aziende produttrici di abbigliamento sportivo che utilizzano ancora sostanze pericolose tra cui composti perfluorurati (PFCs). *Greenpeace*, attraverso la campagna *Detox*, è riuscita a coinvolgere la maggior parte dei *brand*, riuscendo ad ottenere risultati positivi in termini di eliminazione di sostanze chimiche pericolose. In Italia il gruppo 'Valentino' ha aderito a tale campagna dimostrandosi, in questa occasione, tra i leader del cambiamento⁷. Un'altra iniziativa, che di interesse, in quanto è molto seguita, è quella denominata ZDHC, *Zero Discharge of Hazardous Chemicals* che rappresenta il lavoro congiunto di più di venti *brand* mondiali, i quali stanno collaborando per determinare nuovi standard di *performance* ambientali⁸.

La Camera Nazionale della Moda Italiana considera la sostenibilità una priorità, e sta lavorando allo sviluppo di standard più rigorosi nel rispetto dell'ambiente e della salute, in collaborazione con diversi *brand*

nazionali e altri operatori del settore. Per orientarsi verso una produzione tessile più sostenibile, è necessario pertanto prendere in considerazione quattro importanti aspetti:

- *eliminare i rischi ambientali*
- *minimizzare/eliminare l'inquinamento ed i rifiuti*
- *raggiungere un efficiente uso delle risorse*
- *accrescere la tracciabilità delle materie utilizzate nella produzione.*

La Camera Nazionale della Moda Italiana ha quindi promosso nel corso del 2012 il "Manifesto della sostenibilità per la moda italiana", che risulta organizzato per fasi della catena del valore, cui si aggiungono alcuni principi orizzontali.

Il "Gruppo *H&M*", come d'altronde anche il "Gruppo Inditex" (proprietario di diversi brand tra cui "Zara" e "Massimo Dutti") ed il "Gruppo *The GAP*", pubblicano regolarmente i propri report non finanziari condividendo i risultati migliori e le azioni completate a protezione dell'ambiente o dei lavoratori e delle categorie svantaggiate. Nel mondo del lusso, che è sicuramente il più rilevante per il mercato italiano, la situazione è diversa. I grandi gruppi del lusso, in particolare il "Gruppo *Kering*" ed il "Gruppo LVMH" che possiedono molti dei *brand* italiani, stanno dimostrando un impegno considerevole per rafforzare la propria posizione come leader del cambiamento verso un mercato più sostenibile e responsabile. Il Gruppo *Kering* (ex PPR), che è una holding multinazionale francese fondata dall'imprenditore Francois Pinault che comprende diversi marchi (Divisione Lusso, Divisione Sport & Lifestyle e Retail) distribuiti in 120 Paesi, ha pubblicato nel 2015 i risultati del primo *Environmental Profit & Loss*, una

metodologia sviluppata in collaborazione con PWC (*Price WaterHouse*) per misurare gli impatti ambientali generati durante il processo di produzione. Dando un valore monetario a tali impatti è possibile fornire una valutazione di più facile comprensione per il pubblico.

Tale analisi condotta da *Kering* ha valutato un utilizzo dei servizi ambientali pari a € 773 milioni, con un impatto generato dall'utilizzo della terra nella produzione di materia prima. Un altro impatto molto consistente è derivato dalle emissioni di gas serra durante la produzione e lavorazione delle materie prime. Oltre a misurare gli impatti ambientali, il Gruppo *Kering* sta investendo consistenti risorse nella ricerca di sistemi e materiali che possano contenere gli impatti ambientali offrendo sempre dei prodotti di altissima qualità.

Attraverso l' "*E P&L*", il Gruppo *Kering* ha creato un ottimo strumento per migliorare la trasparenza della propria produzione. Il Gruppo *Kering*, grazie alla maggiore trasparenza, potrà vantare un migliore rapporto con gli *stakeholder* i quali hanno la possibilità di poter individuare quali sono le aree di miglioramento, e quindi le opportunità.

L' "*E P&L*", vuole rappresentare quindi uno strumento di trasparenza rivelando da una parte punti sensibili e di debolezza del gruppo, dall'altra un modo per interagire ancor di più con gli *stakeholders*. Condividendo questi dati il gruppo diretto da Francois-Henry Pinault potrà migliorare le proprie performance ambientali. Ogni brand del gruppo è stato chiamato a riportare i dati delle proprie performance ambientali nella produzione, in quella che è definita una dimensione *'cradle to gate'*⁹. L'altra holding multinazionale specializzata nei beni di lusso LVMH (*Moët Hennessy Louis Vuitton S.A.*),

con circa 77.000 dipendenti, ha sviluppato il proprio piano di impegno ambientale attraverso il programma LIFE che, come altre iniziative, ha visto impegnato il gruppo di Bernard Arnault¹⁰. In linea con l'obiettivo di ridurre le emissioni, LVMH nel novembre 2015 ha lanciato un 'fondo interno' che ha come obiettivo quello di 'tassare' in base alle emissioni prodotte i brand del gruppo. Gli importi ricavati da queste 'penalità ambientali' verranno reinvestiti in progetti che aiuteranno il gruppo a migliorare le proprie prestazioni in relazione all'ambiente. Ogni brand nel 2016 verserà € 15,00 per tonnellata di CO₂ prodotta. Tale fondo, al momento del lancio era già stimato intorno ad i cinque milioni di euro¹¹.

L'Italia, in base alle considerazioni fatte in precedenza, è certamente uno dei paesi più attivi nel panorama mondiale per quanto riguarda il sistema moda ed è quindi chiamata a dare segnali per rappresentare un ruolo di leader del cambiamento indirizzato verso la sostenibilità. Tra i brand più attivi, possiamo ricordare il marchio "Gucci", appartenente al Gruppo Kering, che, dallo scorso anno, con il nuovo CEO Marco Bizzarri (ex CEO di Bottega

Veneta) ha dimostrato come la sostenibilità ambientale sia un elemento fondamentale del *business*.

Gucci, attraverso l'utilizzo più efficiente di materia prima è riuscito a ridurre notevolmente la produzione di rifiuti e quindi l'utilizzo di risorse; attraverso questo approccio innovativo al cashmere, le fibre scartate sono state riutilizzate per nuovi tessuti. Tale utilizzo degli scarti è possibile attraverso un procedimento interamente meccanico e senza l'utilizzo di acqua.

È evidente che questa iniziativa si può inserire a pieno titolo in quello che gli autori ritengono la nuova frontiera della moda, ovvero la valutazione della cosiddetta 'impronta idrica'. La "Water Footprint", infatti, è un indicatore del consumo di acqua dolce che include sia l'uso diretto che indiretto di acqua da parte di un consumatore o di un produttore.

Un'altra azione degna di nota, all'interno del Gruppo Kering, è l'acquisto da parte del brand "Bottega Veneta", di pellami lavorati attraverso un sistema di concia della pelle che non utilizza, né metalli pesanti, né cromo. A questo proposito si segnala che le modifiche al Regolamento Europeo REACH n. 1907/2006 e s.m.i., nell'utilizzo del cro-

mo esavalente, hanno fatto registrare una riduzione del cromo rispetto ai valori registrati nel passato¹².

Un altro marchio italiano molto famoso, "Ermenegildo Zegna", ha fondato l'Oasi Zegna (*realizzata con il patrocinio del FAI*), un parco naturale nelle Alpi Biellesi che nasce nel 1993 e che mira al rispetto dell'ambiente, al mantenimento dei luoghi ed all'educazione sociale.

Anche il "Gruppo Tod's" ed il "Gruppo Benetton" sono attivi nella ricerca di tecnologie e pratiche per il controllo degli impatti ambientali e la riduzione dell'utilizzo di risorse energetiche. Il "Gruppo Prada" ha recentemente pubblicato il proprio *CSR Report (Corporate Social Responsibility)*, dichiarando pubblicamente il proprio impegno nella responsabilità sociale d'impresa, così come molti altri brand, tra cui "Fendi" e "Brunello Cucinelli", finanziano opere pubbliche per la salvaguardia del nostro patrimonio culturale. Le aziende italiane da oggi, per rafforzare la competitività e il loro ruolo primario, sono chiamate a impegnarsi in un percorso di 'sostenibilità nella moda' attraverso l'adozione di modelli di gestione responsabile lungo tutta la catena del valore.

¹ 'Il settore tessile in Italia: fibre naturali e comfort' – LaMMA,2005

² https://step.oeko-tex.com/en/step/step_home/home.html

³ <http://www.global-standard.org/>

⁴ <http://www.fairtrade.org.uk/>

⁵ <http://bettercotton.org/>

⁶ <http://www.bluesign.com/>

⁷ <http://www.greenpeace.org/international/en/campaigns/detox/fashion/detox-catwalk/#valentino>

⁸ <http://www.roadmaptozero.com/>

⁹ <http://www.kering.com/en/sustainability/epl>

¹⁰ <http://www.lvmh.com/group/lvmh-commitments/environment/>

¹¹ <http://www.lvmh.com/group/lvmh-commitments/environment/lvmh-establishes-internal-carbon-fund/>

¹² http://www.tuv.com/media/india/informationcenter_1/softlines_1/Restriction_of_Chromium_VI_for_Leather_Articles_in_EU_REACH.pdf



COSA SUCCEDDE IN CITTÀ

La tangenziale ‘verde’, una proposta di riqualificazione urbana per Roma

di **Roberto Antonio Di Marco** e **Bruna Felici**, *ENEA*

Negli ultimi anni, la zona limitrofa alla Stazione Tiburtina e a un tratto della Tangenziale Est di Roma è stata oggetto di un profondo cambiamento evolutivo con la realizzazione del complesso infrastrutturale della nuova Stazione ferroviaria Cavour–Stazione Tiburtina. Nell’articolo si dà spazio a una proposta di riqualificazione urbana presentata al Comune di Roma in occasione dell’avvio del processo partecipativo relativo all’area del Piazzale della Stazione Tiburtina e della Tangenziale Est fino alla Batteria Nomentana

Nei precedenti numeri della rubrica si è cercato di descrivere le complessità delle trasformazioni che stanno interessando le grandi aree urbane del pianeta. Sono state raccontate le esperienze di Milano e Lione, città europee in cui si stanno sperimentando nuove politiche di pianificazione del territorio per la realizzazione di comunità intelligenti e integrate. Sebbene tali buone pratiche si stiano diffondendo un po’ ovunque, occorre sottolineare che siamo di fronte a processi complessi e non lineari che presentano molteplici rischi soprattutto nella gestione e distribuzione delle risorse di un territorio. L’esclusione e la marginalità costituiscono i grandi rischi sociali legati a uno sviluppo senza sostenibilità, fatto di sfruttamento del territorio, di dissennata cementificazione e distruzione del paesaggio.

Contenere il consumo di suolo e puntare sulla rigenerazione urbana sostenibile risultano scelte fondamentali per invertire le politiche di pianificazione territoriale verso una visione razionale e lungimirante. Trasformare luoghi vecchi e abbandonati riconvertendoli in modo sostenibile consente di recuperare lo spazio fisico e la memoria dei luoghi con l’ulteriore opportunità di poter scegliere nuove destinazioni d’uso più consone ad un utilizzo consapevole e razionale da parte dei cittadini.

A partire dall’ultima decade del secolo scorso alcune Città metropolitane come New York, Londra, Parigi, Berlino, Amsterdam, Barcellona, hanno avviato un processo di ‘rinascimento urbano’, attuando una serie di progetti, a volte sperimentali, di riconversione e rigenerazione urbana di vaste aree dismesse, spesso collocate a ridosso dei centri storici.



L'attuazione di un percorso partecipativo nella progettazione e realizzazione di un intervento di rigenerazione urbana costituisce un elemento cruciale dal momento che la fruizione di uno spazio la determina in gran parte la comunità locale, per le sue caratteristiche e i suoi bisogni. Diverse sono le esperienze realizzate nel mondo, alcune già funzionanti come la *Promenade Plantée* di Parigi, nota anche come *Coulée Verte*, che è stata la prima passeggiata verde realizzata alla fine degli anni 90 del secolo scorso recuperando in maniera sostenibile un tratto di una ferrovia in disuso da vent'anni, il parco del Turia di Valencia, il *Dalston Eastern Curve Garden* di Londra, la famosa *High line* di New York e altre, dove comunque esiste un progetto in avanzata fase di elaborazione.

In questo articolo si vuole presentare una proposta per la Tangenziale Est di Roma partendo dalla descrizione dell'esperienza della *High line* di New York. Verrà quindi illustrata la proposta presentata dall'associazione RES¹ in occasione del processo partecipativo che il Comune di Roma ha avviato sul tema della riqualificazione del Piazzale della Stazione Tiburtina e della Tangenziale Est fino alla Batteria Nomentana².

New York High Line: la ferrovia sopraelevata e abbandonata trasformata in giardino panoramico metropolitano

Nel decennio del 1860, a New York, nella zona del *West Side* di Manhattan allora scarsamente popolata, iniziò la costruzione di una ferrovia con una porzione di binari lunga circa 2,3 km, larga tra i 10 e i 20 metri, sopraelevata dal terreno ad un'altezza di circa 9 metri.

A partire dagli anni sessanta del secolo scorso, con lo sviluppo sempre più massiccio del trasporto su strada, alcuni tratti furono dismessi e nel 1980 si decise di dismettere l'intera linea ferroviaria.

L'idea principale della proprietà della ferrovia e dello stesso Sindaco di New York era quella di demolire tutta la parte sopraelevata della ferrovia, in quanto considerata struttura fatiscente e inutilizzata per poi rivitalizzare il sottostante percorso viario creando così una nuova zona residenziale e terziaria.

Anche molti dei residenti locali che avevano sempre percepito la struttura come 'brutta' e come ostacolo al futuro sviluppo e trasformazione dell'area erano favorevoli alla

demolizione in quanto temevano che la ferrovia abbandonata potesse attirare criminali, senz'altro o anche semplicemente altro degrado.

Invece, altri cittadini residenti, con una mentalità più aperta e lungimirante, videro nella *High Line* un'opportunità per creare spazi pubblici in un ambiente urbano assai denso e riuscirono a far prevalere la loro idea di preservare in maniera sostenibile il manufatto: il tracciato ferroviario, dopo un abbandono di oltre 25 anni, è stato trasformato in un parco pubblico divenendo un'eccellente opportunità per spazi pubblici, sia con la realizzazione di spazi di incontro, sia con la creazione di un ambiente più salubre grazie alla vegetazione e a certi tipi di coltivazioni.

Alla base del progetto di riqualificazione vi erano una serie di obiettivi prefissati, pienamente raggiunti: promuoverne l'utilizzo ad uso esclusivamente pedonale, aumentare spazi verdi e luoghi di ritrovo, conservare un pezzo di storia della città, creare un percorso lento in contrasto con la caoticità di Manhattan, realizzare un parco che preservasse un luogo in cui la natura si integrasse sull'infrastruttura urbana con un volto nuovo.

La *High Line* ora è un percorso verde ispirato alle rovine post-industriali. Ci sono prati e panchine, sedute e *chaise longue* panoramiche, tutte realizzate in materiale biocompatibile, c'è un tratto di pavimentazione su cui scorre uno strato d'acqua nel quale poter bagnare i piedi. Ci sono ancora dei tratti dei vecchi binari inseriti nella pavimentazione che ricreano il fascino della vecchia linea ferroviaria

e circa 210 specie diverse di piante. Ci sono una serie di giardini in forma di cavità, piattaforme, ponti, collinette, rampe e sovrappassi. Elementi LED ad alta efficienza energetica sono inseriti nelle ringhiere ed illuminano le vie del parco durante la notte.

Oggi la *High-Line*, molto apprezzata sia dal quartiere che dai visitatori (oltre 5 milioni l'anno) è un successo evidente: è uno dei posti più belli di New York, nonché una delle sue più popolari attrazioni turistiche: sicuramente la più famosa tra quelle più recenti. È un luogo di cui possono godere diversi tipi di persone per la capacità che ha di offrire alla cittadinanza svariati tipi di attività per tutto l'anno: da classi di yoga a conferenze e film, da installazioni d'arte ad attività scolastiche all'area aperta, e molto altro.

La *High-Line* è importante sia da un punto di vista turistico sia dal punto di vista economico perché ha saputo attrarre moltissimi investimenti e ha fatto notevolmente lievitare i valori immobiliari dell'area. È anche molto importante dal punto di vista ecologico perché, in un'area urbana ad alta densità, ha generato un habitat biologico e "naturale" grazie a spazi di incontro salubri per la comunità.

Un progetto che sembrava irrealizzabile si è trasformato in un esempio perfettamente riuscito di *agriteculture*, termine coniato dagli americani per indicare l'unione tra agricoltura e architettura sostenibile, il cui obiettivo è proprio quello di recuperare le aree industriali dismesse restituendole alla natura, piantando alberi e colture nel rispetto

Effetto isola di calore

Una espansione urbana non pianificata e non controllata, con la costruzione di edifici e strade asfaltate che hanno un elevato assorbimento solare che incrementano l'accumulo di energia e il rilascio di calore, ha una conseguenza diretta sui cambiamenti climatici e, in particolare, sul riscaldamento globale con fenomeni meteorologici estremi.

In alcune regioni le precipitazioni sono sempre più diffusi, mentre altre sono colpite da siccità e ondate di calore senza precedenti. Ciò può causare inondazioni e un deterioramento della qualità dell'acqua nonché una progressiva carenza di risorse idriche.

Un effetto tipico di questa nuova condizione è il cosiddetto "fenomeno dell'isola di calore urbana", inteso come aumento della temperatura dell'aria nelle città.

Il fenomeno ha un forte impatto su ambiente, energia e salute dell'uomo e per la città di Roma l'aumento della temperatura in zone densamente urbanizzate raggiunge i 6-7 °C (in estate).

L'isola di calore urbana comporta problemi di salute, specialmente per le persone anziane e le temperature più elevate creano le condizioni favorevoli per la formazione di smog e, a causa dell'aumento del consumo di energia elettrica per la refrigerazione, aumenta l'emissione di gas serra.

Una sensibile riduzione dell'effetto isola di calore urbana e delle sue conseguenze, con miglioramenti sui livelli di comfort e con una diminuzione degli usi energetici legati al raffrescamento negli edifici, si ottiene con l'incremento delle zone di verde e con l'utilizzo dell'acqua come "barriera ecologica" e sistema di raffrescamento.

della biodiversità, per rendere la città più vivibile, verde e rilassante.

Roma, 'la Tangenziale verde': il percorso della ex tangenziale est trasformata in isola ecologica con soluzioni tecnologiche innovative

La *High Line* di New York City, pur se in un contesto diverso, condivide con la realtà romana qualcosa di molto importante: la necessità di uno spazio ricreativo pubblico in un ambiente urbano ad alta densità che a Roma troviamo nei pressi della Tangenziale Est, un arco di strada a scorrimento veloce con tratti in sopraelevata.

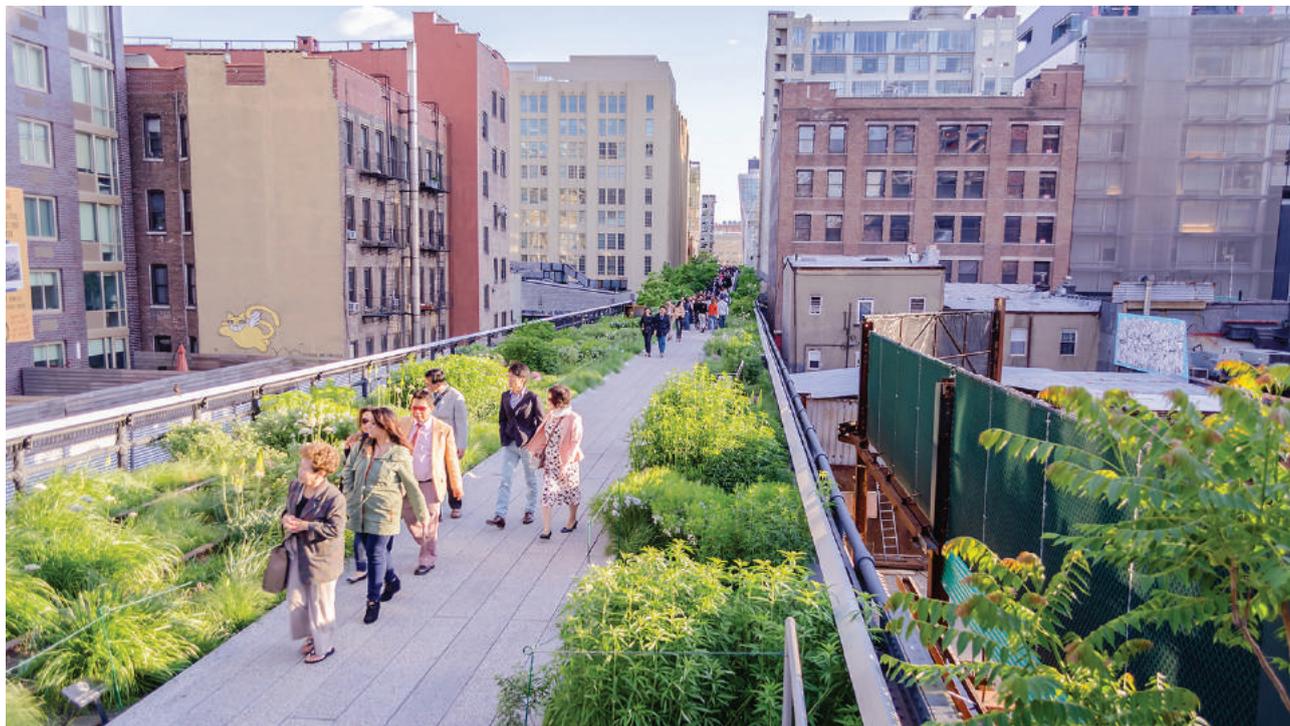
La sua costruzione, avvenuta a partire dagli anni 60, era finalizzata a risolvere problemi di traffico in una zona ad alta densità ma non ha tenuto conto degli effetti dell'impatto ambientale in termini di inquinamento acustico, smog, salute, degrado urbano e delle criticità prodotte sulla vivibilità dei quartieri limitrofi.

Negli ultimi anni, la zona limitrofa alla Stazione Tiburtina e ad un tratto della Tangenziale Est, è stata oggetto di un profondo cambiamento evolutivo che ha visto la realizzazione del complesso infrastrutturale della nuova Stazione ferroviaria Cavour–Stazione Tiburtina di Roma (snodo

principale dell'alta velocità sulla direttrice nord-sud con oltre 500 treni giornalieri) ed il quartiere è divenuto uno dei più strategici di Roma Capitale con un flusso stimato di centinaia di migliaia di viaggiatori che giornalmente transitano per mobilità nelle stazioni.

Ciò ha valorizzato, sia la già presente stazione della metropolitana, garantendo un efficace collegamento con il resto della città, sia la stazione di autobus che garantisce collegamenti transregionali. Gli interventi sono poi proseguiti con altre realizzazioni e con la costruzione di strutture edilizie come la nuova sede del "Gruppo BNL–BNP Paribas" ad opera dello "Studio Architetti 5+1AA". L'altra opera che ha modificato profondamente il quartiere è stata la realizzazione di una bretella sotterranea della vecchia Tangenziale Est che ha lasciato praticamente inutilizzato il troncone di tangenziale antistante la Stazione.

Per rendere compiuta tale evoluzione e completare con nuove coerenti azioni di sviluppo l'opera di riqualificazione urbana di un'area territoriale storica e fortemente legata alla propria tradizione, andando incontro alle esigenze sia dei cittadini che vivono il quartiere sia di coloro che transitano in quel luogo, è stato presentato, promosso dall'Associazione Culturale "RES Ricerca Educazione Scienza", il progetto "Tangenziale verde"³ che trae ispirazione da



una serie di esperienze internazionali di riconversione di strutture viarie abbandonate che si sono realizzate, brillantemente, in altri contesti geografici come la già citata High Line di New York.

Tale iniziativa parte dal progetto “Coltiviamo la Città”, nato nel 2011 a seguito dell’adesione di Roma Capitale all’ “Agenda 21” per le Città, e si prefigge di mantenere l’impianto infrastrutturale della Tangenziale e attuare un’azione di riconversione, riqualificazione e sviluppo nel rispetto dell’ambiente e del tessuto sociale esistente, riconvertendo il tratto della Tangenziale stessa a parco lineare, vero polmone verde ‘produttivo’ per la città.

Il progetto, con molto verde, prevede la realizzazione di un’isola pedonale e un ‘giardino sostenibile’ e autosufficiente, con una attenta distribuzione di aree verdi e di acqua. Prevede inoltre punti di aggregazione sociale e culturale e orti urbani da affidare ai cittadini coinvolgendoli nella gestione e nella manutenzione del verde pubblico.

Il progetto prevede anche:

- il mantenimento della parte aerea dell’ex-Tangenziale come pista ciclabile e percorso pedonale – da utilizzarsi anche come pista di pattinaggio – permettendo così una mobilità “ecologica” in ambito protetto;
- la costruzione di 106 posti auto coperti, per evitare l’effetto “isola di calore” (vedi riquadro), recuperando l’area sottostante la sopraelevata con appositi tamponamenti di “verde urbano”;
- la realizzazione di una efficace barriera ecologica contro CO₂, polveri sottili e materiali pesanti - che separa il tratto della ferrovia dagli edifici limitrofi e dalla città - realizzata attraverso sistemi di irrigazione verticale che utilizzano acqua micronebulizzata, creazione di pareti d’acqua verticali e disposizione strategica di filari di alberi (secondo la rosa dei venti) e siepi come ulteriore barriera filtrante e creazione lungo il tracciato della ferrovia di un muro coperto da vegetazione rampicante per “filtrare” le polveri sottili;
- la realizzazione di un “Osservatorio polifunzionale” (Qualità dell’aria, Meteorologia, effetti dei Cambiamenti Climatici per la città e altro) da utilizzare anche come “Laboratorio a cielo aperto” a disposizione dei cittadini, delle scuole e delle strutture di ricerca per la sperimentazione di soluzioni innovative per la città;
- la realizzazione di “pergole ombreggianti fotovoltaiche”, per l’approvvigionamento di parte dell’energia elettrica necessaria a garantire l’illuminazione notturna

del parco, effettuata con elementi LED ad alta efficienza energetica, e per creare zona d’ombra nel parco. L’illuminazione notturna del parco sarà garantita da pannelli fotovoltaici opportunamente disposti come anche la realizzazione di aree attrezzate con Wi-Fi pubblico;

- la creazione di vari spazi con campi di calcetto e tennis, vitigni, frutteti, *Skatepark* e sale conferenze, aree attrezzate con giochi per bambini, aree per ospitare spettacoli teatrali ed eventi culturali e uno spazio per un mercato a chilometro zero.

Il progetto prevede un monitoraggio ambientale attraverso la predisposizione di biosensori sull’intera area, l’irrigazione dei coltivi con il riciclo delle acque piovane effettuato con un sistema a goccia alimentato da pannelli solari e un sistema di raccolta delle acque meteoriche reflue al fine di consentire l’irrigazione delle aree verdi senza dover utilizzare l’acqua pubblica.

Conclusioni

Il recupero di strutture come la ex tangenziale e la loro trasformazione in beni a servizio della comunità presenta anche un vantaggio economico non indifferente. La realizzazione del progetto a Roma agirà come volano per lo sviluppo residenziale e commerciale nei quartieri circostanti. Il riutilizzo adattivo della Tangenziale, in associazione con investimenti e ristrutturazioni nei quartieri circostanti, preserverà e ringiovanirà l’ex tratto dismesso della tangenziale, generando ulteriori ricavi economici e fiscali per i cittadini e per la Città.

Il progetto vuole avviare un processo di trasformazione ambientale in grado di cambiare il futuro dei quartieri attraversati dalla tangenziale nella consapevolezza che il paesaggio rappresenta un elemento di benessere individuale e sociale.

La Tangenziale Verde può diventare simbolo di modernità e innovazione non solo tecnologica ma anche sociale e attenta all’ambiente, come dovrebbe essere un progetto che guarda al futuro di una Capitale che non necessita più di altro asfalto ma di respirare.

L’auspicio è che l’opportunità di ‘poter’ fare qualcosa nel quartiere possa diventare una ‘opportunità di poter fare qualcosa anche per Roma’ con un’azione di riconversione, riqualificazione e sviluppo di un’area urbana ‘moderna’ e sostenibile dal punto di vista ambientale, da replicare, come modello, in altre realtà similari.

¹ Associazione RES, Ricerca Educazione Scienza, <http://www.associazioneres.org/>

² <http://www.comune.roma.it/pcr/it/newsview.page?contentId=NEW791746>

³ Il progetto ideato dallo studio “Sartogo Architetti Associati” è disponibile su http://www.comune.roma.it/PCR/resources/cms/documents/20150122_TV_Presentazione_2014.pdf

La prossima rivista in uscita a dicembre su:

eai.enea.it



Visita il sito!

