



APPUNTI DI TOSSICOLOGIA DEI RESIDUI

INDICE

- Definizione di residuo
- Classificazione dei residui (pervenuti, aggiunti, neoformati)
- Residui estraibili e non estraibili ("bound residues"), con particolare riguardo al significato tossicologico
- Biodisponibilità e "relay toxicity"
- Fattori in grado di influenzare la formazione dei residui
- Effetti tossici diretti: effetti tossici particolari ed effetti sul sistema immunitario, effetti cancerogeni, mutageni e teratogeni
- Effetti tossici indiretti: antibiotico resistenza
- Valutazione del rischio tossicologico: concetti di "residuo zero", tolleranza residuale e metodi per determinare i Limiti Massimi Residuali

DEFINIZIONE DI RESIDUO

Una delle più redenti definizioni ci è fornita dal D.L.vo n° 336 del 4/8(99 (attuazione delle direttive CEE 96/22 e 96/23) che sostituisce il D.L. 118/92.

In base a tale decreto per residuo si intende “ residuo di sostanze ad azione farmacologica, di loro prodotti di trasformazione, nonché di altre sostanze che si trasmettono ai prodotti di origine animale e che possono essere nocivi per la salute umana”.

Un'ulteriore definizione è: “quantità di xenobiotico o di suoi metaboliti che può accumularsi e/o depositarsi all'interno di cellule, tessuti od organi di animali (destinati all'alimentazione umana) in grado di svolgere un'azione farmaco-tossicologica nei confronti dell'uomo.

Una definizione ancora più precisa può essere: “quantità generalmente piccola di uno xenobiotico, o di suoi metaboliti, presenti in organi ottenuti da animali edibili, o comunque riscontrabili nei prodotti da questi derivati, in grado di determinare possibili effetti farmaco-tossicologici nei confronti del consumatore”.

Per “quantità generalmente piccola” si intende di norma una unità di grandezza corrispondente ai ppb (parti per bilione. Es: 1µg/kg o 1 ng/g).

Le definizioni citate sono di carattere estremamente generale, comprendendo non soltanto farmaci, ma anche contaminanti ambientali, tossine di origine animale e vegetale, composti che vengono ad originarsi in seguito a processi di ordine chimico (es. aggiunta di additivi) o fisico (cottura), ecc.

Molto importante è sottolineare il fatto che per residuo non si deve intendere solo la molecola “parente”, ma anche i prodotti di biotrasformazione risultanti dall'attivazione dei sistemi enzimatici dell'organismo (l'individuazione dei metaboliti è diventata obbligatoria per la registrazione di tutte quelle molecole soggette a venire in contatto con gli animali da reddito (farmaci, fitofarmaci, etc.).

Questo perché:

- a) **molti metaboliti acquisiscono proprietà tossiche diverse** rispetto alla molecola originaria, es. proprietà cancerogene, allergizzanti, capacità di formare legami covalenti con macromolecole, ecc.
- b) **inadeguatezza** di alcune metodiche analitiche inadatte alla messa in evidenza dei metaboliti (es. metodi microbiologici per la ricerca delle c.d. sostanze inibenti).
- c) **cognizioni molto limitate** circa il destino metabolico dei vari xenobiotici negli animali in produzione zootecnica.

* Concetto di quantità di residuo : "livello zero" non più compatibile col la sensibilità raggiunta dalla moderna strumentazione analitica, in grado di misurare agevolmente quantità dell'ordine di nanogrammi/kg o ppt (parte per trilione - 1 nanogrammo = 10⁻⁹ grammi). Normalmente nella misura delle quote residuali di una molecola si usa il µg/kg, anche espresso come ppb (un cucchiaino in una piscina olimpionica).

CLASSIFICAZIONE DEI RESIDUI

Residui pervenuti : si tratta dei residui che ci interessano maggiormente. Riguardano quelle sostanze che raggiungono gli alimenti come conseguenza della contaminazione degli animali per cause dirette od indirette (inquinamento ambientale, trattamenti terapeutici e/o profilattici, contaminazione dei mangimi, ecc.)

Residui aggiunti : sostanze che volontariamente vengono aggiunte agli alimenti per migliorarne qualità, conservabilità e sanità, note come additivi.

Residui neoformati : sostanze che si formano in alcuni prodotti alimentari a seguito di trattamenti di natura fisica (calore, radiazioni) oppure chimica (impiego di additivi). Si tratta di un campo di ricerca ancora relativamente poco esplorato. Esempi: Nitrosamine, amine eterocicliche che si formano durante la pirolisi (cottura) delle proteine e di alcuni aminoacidi o idrocarburi aromatici policiclici (PAH) durante l'affumicamento. Tali molecole destano notevole preoccupazione a motivo della loro riconosciuta attività mutagena.

Residui pervenuti : accidentali ed intenzionali

a) **accidentali**. Sono quelli che pervengono all'animale accidentalmente.
Si possono distinguere :

* contaminanti ambientali: Il diffondersi dell'industrializzazione e dell'impiego di fitofarmaci condiziona ovviamente l'inquinamento dell'ambiente in cui vivono gli animali in produzione zootecnica. Si calcola in circa 60000 il numero di molecole sintetizzate dall'industria chimica e tale numero è destinato ad accrescersi di anno in anno. Sotto questo punto di vista, i nostri animali possono essere considerati dei filtri, in grado di ritenere, ed in qualche caso accumulare, i contaminanti ambientali. Esempi classici sono i metalli pesanti (Hg, Pb, Cd, As), gli organoclorurati (soprattutto i PCB ed insetticidi quali DDT, lindano ed i loro metaboliti) ed i radionuclidi, questi ultimi di grande attualità dopo il recente disastro nucleare di Cernobil. In ogni caso, i contaminanti ambientali agiscono soprattutto inquinando gli alimenti (acqua, foraggi, mangimi) destinati all'alimentazione animale.

* sostanze ad azione medicamentosa Può accadere che, a causa di una preparazione industriale inadeguata, residui di vari principi attivi (integratori, auxinici, ecc.) vengano a contaminare accidentalmente i mangimi. Si tratta del c. d. "fenomeno di trascinamento" per il quale si verifica il passaggio di una certa quantità di principio attivo, rimasto nei macchinari quale residuo della preparazione di un mangime "medicato", in preparazioni "di base" (es. sfarinati di mais o di soia) che non dovrebbero contenerne. E' stato dimostrato che l'assunzione accidentale di alimento contenente alcuni milligrammi (in totale) di sulfamidici può condizionare la comparsa di residui in fegato e rene di animali da macello stimabili intorno a 0.5 ppm. La presenza di tali residui può originare effetti di due tipi :

1) effetti tossici negli animali, in certi casi avvelenamenti ad esito letale (es. monensin nel cavallo), o cali di incremento ponderale;

2) danni economici per la presenza di residui "inattesi" (si pensi alle c.d. "carni di qualità", agli allevamenti di bovini da latte, ecc.)

* biocontaminanti Si tratta sostanzialmente delle micotossine (aflatossine, ocratossine), elaborate da numerose specie di miceti soprattutto durante la fase di stoccaggio delle materie prime o dei mangimi finiti.

b) **intenzionali**. Sono quelli che derivano dalla somministrazione intenzionale di farmaci. Si dividono a loro volta in residui di sostanze usate **a scopo terapeutico** (α) od **a scopo fraudolento** (β).

α) I moderni sistemi di allevamento comportano l'impiego massivo di molecole ad azione farmacologica (antibiotici, chemioterapici, antiparassitari) non soltanto per la cura, ma anche, se non soprattutto, per la profilassi di varie forme morbose a carattere infettivo od infestivo che potrebbero compromettere la produttività degli animali da reddito. E' stata inoltre ampiamente dimostrata, per alcune delle molecole anzidette, un'azione positiva sull'indice di conversione e sull'incremento ponderale. E' ovvio pertanto che l'uso non corretto di tali principi attivi, soprattutto il mancato rispetto del tempo di sospensione (intervallo di tempo che deve intercorrere fra l'ultimo trattamento con un farmaco od una sostanza chimica e la scomparsa di residui pericolosi per la salute umana) possa condizionare la presenza di residui nelle porzioni edibili e nel latte. Appare inoltre evidente che :

* tale categoria di residui è senza dubbio quella di più stretta pertinenza per il Medico Veterinario;

* dati gli enormi interessi economici in gioco, il problema della eliminazione di tali residui è di difficile soluzione.

β) Il tentativo di incrementare ulteriormente le già notevoli performance raggiunte mediante i moderni sistemi d'allevamento ha spinto molti allevatori, sostenuti da operatori di pochi scrupoli, a somministrare principi attivi ormonali sintetici (DES, steroidi anabolizzanti, corticosteroidi) o naturali (estrogeni), sostanze ad azione antiormonale (tireostatici) ed altre molecole (es. β -agonisti). Senza voler entrare nel dettaglio della descrizione della pericolosità di tali residui, occorre sottolineare come per una di tali sostanze (DES) sia ormai confermato il potere cancerogeno.

Un'ulteriore classificazione dei residui (molto importante ai fini della valutazione tossicologica) è quella basata sulla loro proprietà di essere più o meno solubili in alcuni solventi e quindi di essere "estratti" dai tessuti nei quali si accumulano.

Da un punto di vista generale, gli studi sulla quantificazione dei residui nelle produzioni animali comportano la **somministrazione** di una molecola marcata (ad esempio con C^{14}), il **sacrificio** dell'animale sperimentale (a tempi scalari o dopo un determinato periodo di tempo) e la **misurazione della radioattività** (attraverso un β - oppure un gamma counter) nei vari tessuti. Si valuteranno in tal modo i **residui totali**, espressi dalla radioattività tissutale residua (radioattività degli organi a cui viene sottratta la radioattività delle escreta e dell'expirium). Tale misura, tuttavia, fornisce soltanto un'informazione approssimativa, in quanto non ci dà alcuna informazione sulle possibili interazioni avvenute fra il composto in questione ed i costituenti normali dell'organismo, né sulle possibili trasformazioni di carattere metabolico. E' pertanto necessaria un'ulteriore suddivisione dei residui totali in :

a) residui estraibili, che possono essere estratti da un determinato tessuto o fluido biologico per mezzo di numerosi solventi (solv. acquosi di pH diverso, solv. organici), eventualmente anche attraverso l'idrolisi enzimatica degli eventuali metaboliti coniugati, e la denaturazione delle macromolecole proteiche con tecniche diverse (precipitazione, denaturazione con urea, ecc.). Condizione importante è che tutte le summenzionate tecniche non distruggano lo xenobiotico oggetto di studio. Appartengono a questa categoria le molecole originali ed i loro metaboliti in forma libera o legati labilmente ai tessuti.

b) residui non estraibili o persistenti ("bound residues") sono ricavati sottraendo ai residui totali i residui estraibili e fanno parte di quella frazione di radioattività che persiste dopo aver sottoposto il tessuto o fluido biologico ai trattamenti descritti al punto a). Fanno parte dei residui non estraibili:

- * "**composti c.d. endogeni**", derivati dall'incorporazione della molecola oggetto di studio (o di suoi metaboliti) in normali costituenti dell'organismo (es. aminoacidi);
- * "**nuovi composti**", originati dal legame più o meno stabile dello xenobiotico oggetto di studio (o di suoi metaboliti) con macromolecole tissutali (enzimi, DNA, ecc.). In molti casi, i legami sono di tipo covalente ("covalent bindings") e quindi estremamente stabili. A dare questo tipo di legami sono soprattutto i metaboliti che derivano principalmente da un metabolismo ossidativo. Per questo motivo, se si utilizzano dei farmaci induttori dei sistemi enzimatici, si avranno molti più metaboliti e di conseguenza molti più residui non estraibili che sono i più pericolosi.

Da questa suddivisione scaturiscono alcune considerazioni :

1) **I residui estraibili sono residui precoci**. Tale frazione è infatti abbondante nei primi giorni susseguenti la somministrazione di uno xenobiotico (in genere nei primi 5 gg); la natura chimica di tali residui è quasi sempre simile a quella del composto originario.

2) **I residui persistenti** compaiono invece **più tardivamente**; la radioattività a loro imputabile può persistere per alcune settimane e, in alcuni casi, per mesi. La struttura chimica dei "bound residues" può essere molto diversa da quella del composto originario e, proprio a causa dei legami stabili, di difficile ed indaginata identificazione. Questi sono i residui più pericolosi.

3) Dal punto di vista **tossicologico**, i **residui estraibili** (composti originari + metaboliti) possono essere più o meno importanti a seconda ovviamente della molecola considerata. Meno importanti, sotto questo punto di vista, appaiono invece i composti "**endogeni**", mentre i "**nuovi composti**" originati da legami covalenti stabilitisi fra lo xenobiotico (o, più frequentemente, i suoi metaboliti) e le macromolecole tissutali meritano in ogni caso studi tossicologici approfonditi. Molti sono gli esempi di xenobiotici in grado di dar luogo a residui persistenti : alcuni antielmintici (mebendazolo, cambendazolo), nitrofurantici, micotossine (aflatossina B₁). Il numero di tali xenobiotici, con il progredire degli studi, è in continuo aumento.

BIODISPONIBILITA' E "RELAY TOXICITY" DEI RESIDUI

Prima di esaminare gli strumenti di valutazione del rischio tossicologico legato all'assunzione dei residui, occorre definire il concetto di **biodisponibilità dei residui**. Da un punto di vista farmacologico, la biodisponibilità è definibile come la quantità di xenobiotico che perviene in circolo e la velocità alla quale questo fenomeno si verifica. Per quanto concerne i residui, il problema è ovviamente limitato all'entità dell'assorbimento gastroenterico non soltanto del residuo stesso ma anche dei suoi metaboliti. Si definisce **residuo biodisponibile** la quantità della molecola originaria e/o dei suoi metaboliti assorbiti dal tubo gastroenterico e riscontrabili nelle cellule dell'apparato gastroenterico, negli altri tessuti, nei fluidi biologici e nell'*expirium* della specie animale (animale di laboratorio o uomo) che assume l'alimento contaminato. E' chiaro, pertanto, che la semplice presenza di un residuo in un qualunque tessuto edibile non implica necessariamente che tutta la quota residuale sia disponibile per svolgere un'eventuale azione indesiderata nell'organismo del consumatore.

Esistono numerosi metodi per studiare la biodisponibilità dei residui, alcuni dei quali *in vitro*, altri *in vivo*. Fra questi ultimi, il più noto è quello proposto da Gallo-Torres e si basa sulla somministrazione della molecola marcata ad una specie di laboratorio (ratto, cane) o da reddito (generalmente il suino) seguita dal sacrificio dell'animale (a tempi scalari e/o ad un tempo corrispondente al tempo di sospensione) e dalla determinazione della radioattività nei vari organi, fluidi biologici ed escreta per mezzo di uno scintillatore (c.d. residui totali). Successivamente, porzioni di organi contenente le quote residuali vengono somministrate ad un altro soggetto (per solito della stessa specie); la quota residuale biodisponibile di una determinata molecola è rappresentata dalla misura della radioattività negli organi e nei fluidi biologici di quest'ultimo. La radioattività riscontrata nel contenuto del tubo gastroenterico e nelle feci rappresenta invece la quota residuale non-biodisponibile. La biodisponibilità è quindi rappresentata dalla differenza (rapportata a 100) fra la quota residuale biodisponibile e quella non-biodisponibile. Un'altra definizione, solitamente riferita agli animali da reddito, è quella di *carry-over*, che definisce l'attitudine di una specie a trasferire nei propri tessuti o nelle proprie produzioni (latte, uova) uno xenobiotico contenuto negli alimenti. Dal punto di vista critico, occorre sottolineare come difficilmente gli pseudo-consumatori sono realmente assimilabili all'uomo: il cane beagle per esempio, si è rivelato un discreto modello per l'uomo (a differenza del ratto), ma è molto costoso e vi sono norme che ne rendono difficile l'utilizzo ai fini sperimentali. Questi studi in ogni caso non sono finora stati resi obbligatori dalle leggi che regolano la registrazione dei farmaci.

I risultati di tali studi depongono generalmente per una biodisponibilità molto minore dei residui totali in rapporto a quote equivalenti della sostanza tal quale. Ricerche condotte nel ratto con gli antielmintici albendazolo e cambendazolo, ad esempio, hanno evidenziato una biodisponibilità dei residui totali di gran lunga inferiore se paragonata a quella ottenuta dopo somministrazione di quantità equivalenti a quelle residuali. Per il cambendazolo in particolare, la quota residuale presente a livello epatico in ratti alimentati con estratti epatici di bovino trattato con l'antielmintico è pari a circa 1/30 di quella misurabile in ratti alimentati con cambendazolo tal quale.

Pur se genericamente confortanti, gli studi di biodisponibilità non forniscono risultati conclusivi circa la pericolosità dei residui, in quanto non specificano la natura dei residui. I

residui estraibili, ad esempio, presentano generalmente una biodisponibilità superiore ai residui non estraibili. E' inoltre possibile che una molecola di per sè caratterizzata da una biodisponibilità piuttosto bassa, dia origine a metaboliti dotati invece di biodisponibilità maggiore. E' il caso dell'albendazolo, la cui biodisponibilità nel ratto è pari al 31%, mentre tale valore sale al 73% per il suo metabolita sulfossidato ad attività embriotossica.

Un'evoluzione pratica dei suddetti studi di biodisponibilità consiste nella valutazione della c.d. "relay toxicity" (tossicità di ritorno) secondo le metodologie messe a punto da Truhaut e Ferrando. In sostanza, la dieta di animali pseudo-consumatori (ratti, cani, anatroccoli) viene addizionata con estratti di organi (fegato, rene, muscoli) o con latte (liofilizzato) di animali da reddito precedentemente trattati con lo xenobiotico oggetto di studio. La somministrazione di tale dieta è generalmente protratta nel tempo in modo da simulare quanto avviene nell'uomo. Tali tecniche sono state utilizzate ad esempio nell'anatroccolo (in quanto specie più sensibile) nello studio della tossicità dei residui di AFB₁ somministrando latte di capre trattate con alte dosi di tale micotossina. Altre indagini hanno riguardato, ad esempio, la tolleranza ai residui di carbadox e di ormoni steroidei naturali e sintetici (incluso il DES) e l'embriotossicità dei residui di alcuni antielmintici benzimidazolici. I risultati ottenuti hanno fornito indicazioni rassicuranti per tutte le molecole summenzionate ad eccezione del DES, del quale viene confermata l'elevata pericolosità.

Un ulteriore e più mirato approccio per valutare la "relay toxicity" consiste nel somministrare ad animali sperimentali il metabolita marcato (radioattivo) ritenuto responsabile dell'azione tossica. Dopo il sacrificio, muscoli e visceri degli stessi vengono quindi liofilizzati e somministrati ad altri animali per esaminare l'eventuale tossicità. Tale metodo è stato impiegato per valutare la cancerogenicità della 7-metilguanina (l'addotto stabile formato dalla dimetilnitrosamina con il DNA) e dell'AFB₁. In quest'ultimo caso, l'assunzione di liofilizzati di fegati di ratti precedentemente esposti a tossina triziata o marcata con ¹⁴C (che origina prevalentemente "bound residues"), non dà luogo in animali sperimentali a radioattività legata al DNA. Si calcola che, a parità di condizioni, la percentuale di coniugazione al DNA dell'AFB₁ libera sia almeno 100 volte minore rispetto alle frazioni reperibili nei tessuti degli animali trattati.

Gli studi di biodisponibilità e di "relay toxicity" (ancorchè esistenti per un numero piuttosto limitato di molecole) hanno indubbiamente il pregio di riprodurre, sia pure grossolanamente, quanto avviene nella realtà; i limiti di tali indagini consistono soprattutto nella ridotta quantità di residui ottenibili nei vari tessuti. Inoltre, come già accennato in precedenza, l'estrapolabilità dei risultati ottenuti alla specie umana è piuttosto discutibile, a causa delle marcate differenze di ordine fisiologico (pH salivare, gastrico ed enterico, tempo di transito, capacità e lunghezza dell'apparato digerente, dinamica della secrezione biliare) esistenti fra la specie umana e le altre specie impiegate per l'esecuzione di tali indagini. Sotto questo punto di vista, si può affermare come, nel complesso, gli animali da reddito o il cane siano più affidabili rispetto al ratto.

FATTORI CHE INFLUENZANO LA FORMAZIONE DEI RESIDUI E LA LORO EMIVITA BIOLOGICA

La formazione dei residui e la loro eliminazione (e quindi la loro **emivita biologica**, cioè il tempo necessario affinché la quota residuale di uno xenobiotico presente nell'organismo si dimezzi) dipendono da alcuni fattori:

1) **grado di liposolubilità della molecola e dei metaboliti.** Le curve residuali disegnate dagli xenobiotici variano nettamente in rapporto al diverso grado di liposolubilità della molecola e dei suoi metaboliti. In generale, la quantità di residui riscontrabile nell'organismo animale presenta inizialmente una crescita, seguita dalla comparsa di uno "steady state"; segue un periodo di lunghezza variabile durante il quale la quota residuale decresce più o meno lentamente fino ad un ipotetico valore zero. Nel caso di una molecola di elevata liposolubilità (es. eptacloro epossido) la pendenza della porzione di curva decrescente (velocità di eliminazione dei residui) è molto lenta; il valore di plateau raggiunto (steady state) è inoltre generalmente elevato. Nel caso invece di molecole spiccatamente idrosolubili (es. metaboliti del DES) si osserva il raggiungimento di un plateau di entità quantitativamente minore e molto più velocemente rispetto all'esempio precedente; anche la velocità di eliminazione è nettamente superiore, il che implica il raggiungimento del "valore zero" in tempi decisamente più brevi.

2) **Caratteristiche cinetiche dello xenobiotico e dei suoi metaboliti.** Il caso illustrato nell'esempio precedente non rappresenta sicuramente la norma. La sulfametazina o sulfadimidina (SDM) è un farmaco molto usato nelle infezioni batteriche dell'apparato respiratorio, che subisce essenzialmente un processo di ossidazione (P_{450} -dipendente) e di acetilazione a livello epatico. Il processo di eliminazione della SDM e del suo metabolita acetilato è bifasico; nel suino, dopo sospensione del trattamento, ad una prima fase di eliminazione piuttosto rapida (emivita di 10-14 ore), segue una seconda fase molto più lenta stimabile intorno ai 5-8 giorni. Un comportamento analogo è stato dimostrato per il cloramfenicolo, mentre per molti altri xenobiotici, l'eliminazione è ancora più complessa in quanto avviene con un comportamento multifasico. Questo processo (che incide in maniera determinante sui tempi di sospensione) può essere spiegato ammettendo l'esistenza di recettori specifici tissutali che, ad alte concentrazioni di farmaco presentano un fenomeno di saturazione. In tale modo, quote sostanziali della molecola possono transitare liberamente, per diffusione inversa, dai tessuti al circolo, rendendosi disponibili per l'eliminazione. Dopo un certo periodo di tempo, la diminuzione della quantità di farmaco presente nell'organismo non consentirà più un altrettanto veloce passaggio dai tessuti al sangue, anche a causa del legame relativamente stabile farmaco-recettoriale. Ciò causa un ostacolo alla eliminazione del farmaco e rende ragione della bifasicità della cinetica della SDM.

3) **Via di esposizione.** La via di esposizione **orale** condiziona generalmente un minore assorbimento e quindi una minore quota residuale a carico di muscoli e visceri in rapporto alla **via parenterale** (questo vale a parità di numero di somministrazioni). Ad esempio, per gli antibiotici aminoglicosidici (streptomicina, kanamicina, neomicina, ecc.) l'eliminazione dei

residui avverrà intorno alle 24 ore dopo assunzione per os, entro 6 settimane a seguito di somministrazione per via parenterale. Tale sensibile differenza è dovuta soprattutto allo scarso assorbimento di tali antibiotici. Nel caso di **impianto sottocutaneo** (usato in passato per il DES), la "clearance" residuale (velocità di eliminazione) è invece nettamente superiore rispetto alla via orale. Naturalmente i tessuti circostanti il luogo dell'impianto od il punto di inoculo (in caso di somm. per via i.m.) possono contenere elevate quantità residuali.

4) **Veicolo**. Per quanto riguarda i farmaci, le preparazioni ritardo ovviamente comporteranno una eliminazione più lenta e quindi un tempo di sospensione più lungo. Ad es. ormoni steroidei esterificati con acidi grassi a lunga catena (oleico o stearico) utilizzati per gli animali da reddito.

Ricordare che l'uso di ormoni estrogeni, androgeni e progestinici negli animali da reddito è consentito solo per la cura dell'apparato genitale e sotto stretto controllo medico. Di solito queste preparazioni vengono supportate con dei solidi e questo se da un lato consente una maggiore validità terapeutica, dall'altro rappresenta un maggiore pericolo per quanto riguarda i residui.

5) **Biotrasformazioni**. L'importanza dei processi biotrasformativi subiti dagli xenobiotici negli animali domestici è fondamentale nel condizionare natura chimica, quantità e velocità di eliminazione dei residui. Senza voler riesaminare in dettaglio quanto già descritto nel corso di Tossicologia (al quale si rimanda), basterà ricordare come i processi biotrasformativi, che hanno luogo non soltanto nel fegato, ma anche in altri organi (intestino, rene, gonadi, surreni) si dividano essenzialmente in reazioni di **ossidazione** catalizzate dalle monossigenasi microsomiali (sia citocromo P₄₅₀-dipendenti, sia flaviniche), reazioni di **idrolisi**, catalizzate da esterasi o amidasi, reazioni di **riduzione** e reazioni di **coniugazione** operate da numerosi enzimi (glucuroniltransferasi, glutationtransferasi, acetiltransferasi, sulfotransferasi, metiltransferasi, aminoacido transferasi, epossido idrolasi) presenti soprattutto nella fase solubile della cellula ma talvolta anche a livello microsomiale. I processi biotrasformativi generalmente danno origine a metaboliti **più polari** e quindi più facilmente eliminabili; in qualche caso invece (es. alcuni organoclorurati), i metaboliti ossidati mantengono elevate caratteristiche di liposolubilità (vedi paragrafo 1). I processi biotrasformativi non sempre hanno carattere detossificante, ma talvolta costituiscono la "conditio sine qua non" affinché uno xenobiotico acquisti particolari proprietà tossiche (c.d. bioattivazione).

Molti sono i fattori in grado di **influenzare** l'attività dei sistemi enzimatici biotrasformativi (specie, età, sesso, particolari condizioni fisiopatologiche, somministrazione contemporanea di xenobiotici diversi).

* specie : recenti ricerche tendono a sottolineare le diversità interspecifiche esistenti fra gli animali da reddito. Limitandosi soltanto all'esame delle biotrasformazioni ossidative, esistono differenze sensibili di natura **quantitativa** e **qualitativa**. Nel primo caso, se valutiamo il contenuto di citocromo P₄₅₀ a livello epatico e lo rapportiamo ad 1 kg di peso vivo, potremo rilevare differenze sostanziali, ad esempio, fra l'ovino (477000) ed il bovino (88000). Tali differenze sono ovviamente ancora più marcate se consideriamo il ratto (4757000) od il topo (10573000). Dal punto di vista **qualitativo**, le differenze non sono meno importanti. Il Febantel (FB) è un antielmintico benzimidazolico che viene ossidato a sulfossido (FBSO) dalle monossigenasi microsomiali; ciascuno di questi due composti viene a sua volta ciclizzato per formare rispettivamente il fenbendazolo (FBZ) e l'oxfendazolo (OXF), composti a loro volta dotati di attività antielmintica. La reazione FB → FBSO avviene in maniera più intensa nella

specie ovina; ponendo tale valore uguale a 100, e valutando comparativamente su sistemi microsomiali *in vitro* quanto avviene in altre specie, si osservano risultati sorprendenti, con variazioni comprese fra l'8% della trota, il 23 % del ratto, il 29% del bovino ed il 56% del suino. Se si esamina con analoga metodologia la produzione di OXF a partire dal FB, si nota come la specie nella quale tale processo avviene più attivamente è il suino; anche in questo caso, l' esame comparativo interspecifico fornisce dati molto contrastanti con percentuali variabili dallo 0% del ratto, al 3% nel bovino ed al 43% della pecora. Nel caso degli antelmintici benzimidazolici, il problema non è soltanto limitato ad implicazioni di carattere terapeutico, ma è di stretta pertinenza tossicologica, in quanto FBSO e OXF hanno attività teratogena.

* età : l'attività dei sistemi biotrasformativi ossidativi e coniugativi è generalmente più bassa nei neonati e nei giovani rispetto agli adulti. Ciò condiziona soprattutto una ridotta clearance nei confronti di molti xenobiotici (es. SDM nel bovino) con possibilità di accumuli residuali di maggior entità (e necessità di tempi di sospensione più lunghi).

* sesso : può influire in maniera determinante sull'emivita biologica degli xenobiotici. Negli animali da laboratorio, la capacità biotrasformativa è generalmente maggiore nel maschio. Nei nostri animali le differenze fra i sessi , ancorchè più sfumate, sembrano manifestarsi in senso opposto. Recenti studi condotti con la SDM (molecola modello) nella capra dimostrano infatti come la clearance di tale sulfamidico sia più veloce nella femmina rispetto al maschio. Femmine trattate con testosterone e maschi castrati trattati con estradiolo benzoato riproducono sostanzialmente gli andamenti osservati rispettivamente nei maschi e nelle femmine interi.

* particolari condizioni fisiopatologiche : per quanto concerne la *gravidanza*, nelle specie animali da reddito le conoscenze sono piuttosto limitate. Ricerche condotte nella capra dimostrano come l'emivita di alcuni sulfamidici sia significativamente aumentata in capre gravide. Studi eseguiti su animali in produzione zootecnica hanno evidenziato come condizioni patologiche varie quali *parassitosi* (fascioliasi, coccidiosi) e *malattie infettive* tendano generalmente a ridurre le capacità biotrasformative, influenzando quindi l'emivita di molti xenobiotici. Ad esempio, un allungamento notevole della clearance di cloramfenicolo e trimethoprim è stata osservata in vitelli da carne sperimentalmente infettati con *Salmonella dublin*.

* somministrazione contemporanea di xenobiotici : gli effetti determinati dall'interazione fra diversi xenobiotici sulle rispettive clearance residuali sono tuttora oggetto di intenso studio nelle specie in produzione zootecnica. La somministrazione di *induttori* dei sistemi biotrasformativi quali il fenobarbital è stata preconizzata nella specie bovina nel tentativo di ridurre l'emivita biologica degli organoclorurati. Maggiore interesse pratico rivestono gli *inibitori* enzimatici, quali il cloramfenicolo e la tiamulina. Quest'ultima (un chemioterapico molto usato nella terapia delle forme influenzali del suino), se somministrata contemporaneamente al monensin od alla salinomina (antibiotici ionofori usati come coccidiostatici e promotori di crescita), può diminuire sensibilmente il metabolismo epatico P₄₅₀-dipendente di tali composti determinandone un accumulo a carico dei visceri e, in qualche caso, provocando manifestazioni tossiche acute anche mortali.

6) **Sesso**. Condizioni legate al sesso femminile quali la gravidanza, la lattazione e l'ovodeposizione costituiscono altrettante "occasioni" per il trasferimento di quote residuali importanti delle quali si dovrà tenere conto, ad esempio nell'effettuazione di terapie di massa

o di interventi rivolti alla profilassi di malattie batteriche o parassitarie.

7) **Particolari organotropismi.** In condizioni normali, i residui tendono ad accumularsi soprattutto negli organi deputati al metabolismo ed all'escrezione degli xenobiotici, cioè in fegato e rene. Ricordiamo inoltre come negli animali in lattazione, la ghiandola mammaria assuma particolare importanza quale via escretoria addizionale. In fegato e rene è più facile che, a seguito di particolari reazioni metaboliche, avvengano legami che rallentano sensibilmente l'eliminazione o danno luogo addirittura a residui persistenti (vedere anche quanto illustrato al punto 2 a proposito delle cinetiche di eliminazione). Per tale motivo, le carni (i muscoli) degli animali da reddito tenderanno ad accumulare residui in concentrazioni da 10 a 100 volte inferiori rispetto a quelle riscontrabili in fegato e rene (attenzione però al punto di inoculo!! Ciò vale soprattutto per le preparazioni ritardo, facilmente in questi casi si formano dei sequestri e degli accumuli e, visto che normalmente i trattamenti vengono effettuati a livello dei quarti anteriori e che questi finiscono negli hamburger, il fatto può costituire un problema molto serio.). Esistono tuttavia alcune significative eccezioni; nel caso del piombo, delle tetracicline e di molti radioisotopi, si verificano accumuli importanti nelle ossa. Tutti gli organoclorurati (DDT e simili, PCB) hanno un tropismo particolare per il tessuto adiposo e gli organi ricchi di lipidi (fegato, SNC). Ci sono poi gli accumuli di cadmio, decisamente eccezionali dal punto di vista quantitativo, nel rene del cavallo (fino a 20-30 ppm), determinati da una sintesi massiva di metallothioneine caratteristica di tale specie.

E ancora i β agonisti che si fissano ai tessuti pigmentati come il pelo e la retina. Nel pelo pigmentato si possono trovare fino a 18 settimane dopo il trattamento. Infine ricordiamo il cadmio che in forma inorganica ha come target il rene, mentre i suoi derivati organici (metil e dimetil-mercurio) si accumulano nel SNC.

8) **Dose, numero di somministrazioni (o durata dell'esposizione) e loro intervallo.** Tali fattori possono acquisire importanza nel caso di molecole caratterizzate da un assorbimento od un'escrezione piuttosto lenta, come ad esempio le preparazioni ritardo o gli antibiotici aminoglicosidici se somministrati per via parenterale.

9) **Tempo di sospensione.** La sua inosservanza rappresenta il motivo principale per cui le derrate contengono residui di farmaci (anche perché il mercato dei farmaci è in mano a tutti tranne che ai medici veterinari).

RISCHI TOSSICOLOGICI LEGATI ALL'ASSUNZIONE DEI RESIDUI

Si dividono in rischi **diretti**, derivanti cioè direttamente dall'assunzione di alimenti contenenti residui, ed **indiretti**, derivanti indirettamente dall'assunzione (es: antibiotico-resistenza.).

I **rischi diretti**, accertati o potenziali, a loro volta si distinguono in :

- fenomeni tossici, acuti o cronici, comprese reazioni farmacologiche esagerate;
- effetti sul sistema immunitario, soprattutto allergici e iperergici, a volte immunosoppressivi;
- effetti mutageni;
- effetti cancerogeni; effetti teratogeni.

1) Fenomeni tossici. In linea del tutto ipotetica, moltissimi xenobiotici, anche se assunti in quantità modeste quali quelle residuali (raramente ppm, più spesso ppb) potrebbero dar luogo a sindromi tossiche nell'uomo. E' tuttavia molto difficile stabilire un rapporto causa-effetto fra l'ingestione di un alimento contaminato da un particolare residuo e l'insorgenza di una manifestazione tossica: le patologie indotte, infatti, sono il più delle volte croniche o sub-acute. Sono pertanto inquadrabili in questa categoria gli effetti derivanti dalla (possibile) assunzione di residui di alcune molecole dotate di un'azione tossica particolare nei confronti di un organo o di un apparato bersaglio. Le molecole responsabili di tali episodi non sono molte; il cloramfenicolo è in grado di determinare gravi forme di anemia aplastica e granulocitopenia anche mortali (soprattutto nei giovani in quanto colpisce il midollo osseo), la patogenesi delle quali è tuttora sconosciuta. La sensibilità al cloramfenicolo varia fino a cento volte su base individuale e per questo è stato incluso nell'allegato 4 del regolamento CEE 2377/90 il quale vieta il loro utilizzo in animali che producono alimenti per l'uomo. Episodi di tossicità renale possono verificarsi quando vengano assunte cospicue quantità di residui di sostanze a prevalente eliminazione renale come ad esempio i sulfamidici e gli antibiotici aminoglicosidici. Sindromi depressive od eccitatorie possono verificarsi in seguito all'ingestione di residui rispettivamente di tranquillanti o di alcuni aminoglicosidici (es. streptomina). Per quanto riguarda i contaminanti ambientali, l'esempio classico è costituito dall'episodio di Minamata, verificatosi a carico di pescatori giapponesi che si nutrivano quasi esclusivamente di pesce contenente elevate quantità di metilmercurio, il quale deriva dalla metilazione del mercurio inorganico che viene scaricato nei fiumi e nei mari. I sintomi principali consistevano in turbe del sistema nervoso (parestesie, atassia e disturbi della visione) e in danni renali, entrambi trasmessi alla progenie. Le dosi responsabili di questi effetti sono dell'ordine di 30-44 ppm per tempi prolungati. Queste concentrazioni non sono difficili da raggiungere, ma per evitare il rischio è sufficiente seguire un'alimentazione varia. Ancora possiamo ricordare i nitrati e i nitriti che hanno un'azione metaemoglobinizzante (la metaemoglobina non lega l'ossigeno) e che vengono utilizzati come fertilizzanti. Ciò comporta l'inquinamento delle acque, e l'accumulo in alcune piante. I neonati sono più a rischio in quanto possiedono ancora molta emoglobina fetale che è più sensibile di quella adulta, sono sufficienti 50 ppm (è a rischio il latte ricostituito con acqua inquinata). Nelle carni e negli insaccati queste sostanze vengono utilizzate come stabilizzanti del colore e come batteriostatici (evitano la pullulazione del *Clostridium botulinum* e quindi la formazione della tossina). Sono dei potenti nitrosanti di tutti i gruppi amminici e questo porta alla formazione di nitrosammine che hanno una elevatissima capacità

cancerogena; molto pericolosa è l'associazione di alcool e insaccati che sovente porta all'insorgenza del cancro a livello di esofago, stomaco e intestino. La tossicità legata a queste sostanze si può dividere in acuta (dovuta ad alte dosi introdotte con vegetali o acque inquinate) e cronica (a causa di metaboliti quali le nitrosammine assunte per lunghi periodi). Si usano lo stesso in quanto il rischio legato alla presenza del botulino è considerato maggiore. Un altro inquinante tipico del mondo industrializzato è il cadmio. Il suo accumulo è legato all'età e si verifica soprattutto nel cavallo. Provoca danni sia a livello renale che osseo. Le manifestazioni nell'uomo erano legate all'assunzione di prodotti vegetali trattati con fungicidi a base di cadmio che poi sono stati vietati (itai-itai disease che vuol dire "ho male-ho male"). Da sottolineare infine, in quanto si tratta della prima intossicazione acuta susseguente all'ingestione di residui di una molecola ad azione farmacologica, gli episodi di intossicazione descritti in Francia ed in Spagna in soggetti che si erano alimentati con fegati di bovini contenenti 0,2-0,5 ppm di clenbuterolo, un farmaco β -agonista illegalmente usato quale agente di ripartizione. I sintomi erano rappresentati da tremori, mal di testa e senso di vertigine.

2) Effetti allergizzanti. L'ingestione di numerosi alimenti di origine animale (uova, latte, pesce, carne, crostacei) può essere causa di reazioni di tipo allergico. Nonostante l'opinione corrente, la maggior parte di tali fenomeni è attribuibile a molecole naturalmente presenti nei cibi. Infatti, soltanto un numero relativamente contenuto di farmaci, soprattutto antibiotici e chemioterapici, è dotato di proprietà allergizzanti che possono manifestarsi a seguito di interventi di carattere terapeutico. Ancora minore è il numero di casi, scientificamente documentati, nei quali si sono verificati episodi allergici in seguito all'assunzione di quote residuali di farmaci (tramite latte o carni) od altri xenobiotici. Ciò premesso, il problema dell'assunzione di residui ad azione allergizzante non deve essere sottovalutato, poiché:

- a) i fenomeni allergici sono in costante aumento nella popolazione mondiale;
- b) non è escluso che la via alimentare rappresenti una delle vie principali attraverso la quale gli individui si sensibilizzano nei confronti di alcuni farmaci, manifestando successivamente gravi forme di intolleranza in seguito a somministrazioni terapeutiche.

Affinché uno xenobiotico possa dar luogo ad una reazione allergica (cioè diventare un aptene), è necessario che si leghi ad una proteina carrier in circolo o nei tessuti (es albumine, caseine, ecc). Soltanto dopo la formazione del complesso xenobiotico-carrier, l'organismo potrà elaborare anticorpi (IgE che si trovano a livello di mucosa e mastzellen) nei confronti dello xenobiotico stesso: questa fase è conosciuta con il nome di sensibilizzazione. Nel caso di una ulteriore esposizione alla stessa sostanza, gli anticorpi prodotti durante la fase di sensibilizzazione scatenano la risposta immunitaria aberrante, con liberazione di istamina, interleuchina, trombossani, citochine, ecc. che si trovano nelle granulazioni delle mastzellen. Le manifestazioni allergiche sono limitate solitamente a forme cutanee (prurito, arrossamenti, edemi), talvolta accompagnate da fenomeni gastroenterici, mal di testa e senso di vertigine. Nei casi più gravi vi può essere ingrossamento linfonodale e delle articolazioni, broncospasmo, mentre rarissimi sono l'edema di Quinck e le crisi anafilattiche mortali. Fra gli xenobiotici maggiormente implicati nella genesi di forme allergiche (ad eziologia anche non iatrogena) ricordiamo soprattutto le penicilline, per le quali assume notevole importanza quale veicolo il latte (terapia delle mastiti per via intramammaria). A tale proposito, è stato dimostrato che 40 U.I. di benzilpenicillina per ml di latte possono determinare reazioni di tipo allergico in individui sensibilizzati. Va sottolineato che non è la

penicillina, ma un suo metabolita originato dall'azione delle penicillasi batteriche, l'acido penicilloico, che assume la capacità di legarsi ad un carrier proteico e quindi a comportarsi da aptene. Per questa sostanza la normativa ammette una certa dose massima residuale. Le proprietà allergizzanti di aminoglicosidici, sulfamidici e tetracicline (per esse la cottura può inattivare le proprietà allergizzanti) sono invece decisamente minori.

Il latte più a rischio è quello UHT in quanto si tratta del latte di scarto che non può essere usato per la produzione di formaggio.

Sarebbe opportuno prevedere circuiti separati per la cura delle affezioni negli animali e nell'uomo, in modo da evitare che si sviluppino delle reazioni di ipersensibilità nei confronti di dosi terapeutiche di medicinali.

Per quanto riguarda gli **effetti immunodepressivi** scarse sono le conoscenze in proposito, essendo difficile stabilire un rapporto causa-effetto; si hanno forti sospetti su diverse sostanze quali ad esempio cadmio, piombo, PCB, DES (estrogeno di sintesi), aflatossine. Questi sembrano avere azione depressiva sia sull'immunità umorale che su quella cellulo-mediata. La loro azione negativa si esplica a livello di timo, placche di Peyer e follicoli germinativi della milza.

3) Effetti cancerogeni. E' ormai accertato che numerosi xenobiotici sono capaci di indurre la comparsa di neoplasie negli animali da laboratorio e nell'uomo. Mentre per altri effetti (cfr. ad es. effetti tossici od allergizzanti) è possibile nella maggior parte dei casi instaurare una correlazione fra dose ed effetto, nel caso di un effetto cancerogeno di norma non esiste un simile rapporto. Anzi, spesso è vero proprio il contrario, per cui la cancerogenicità di una molecola si manifesta soltanto a dosi molto piccole mentre dosi più elevate si rendono responsabili di effetti tossici. Inoltre, secondo una teoria molto accreditata ("one hit theory") anche una sola molecola che riesca a danneggiare irreversibilmente il DNA (cancerogeno c.d. genotossico) sarebbe sufficiente a determinare la neoplasia. Non tutti gli Autori riconoscono tuttavia la validità di tale teoria; secondo alcuni, per alcuni cancerogeni è possibile individuare, almeno per alcune molecole, una dose esente da rischi. A sostegno di tale opinione viene spesso invocata la differente potenzialità di due noti agenti cancerogeni quali l'aflatossina B₁ ed il DES, le cui dosi in grado di indurre neoplasie in specie sensibili differiscono di circa un fattore 1000. Da quanto sopra esposto scaturiscono le seguenti conclusioni:

* occorre porre la massima attenzione nell'individuazione delle molecole cancerogene;

* nonostante l'esistenza di opinioni discordanti, la presenza delle sostanze cancerogene negli alimenti dovrebbe essere tassativamente evitata ("livello zero").

Dal punto di vista meccanicistico, l'induzione di un tumore da parte di uno xenobiotico è il risultato di una serie di complesse reazioni in qualche modo legate fra loro, essenzialmente distinguibili in due fasi : una fase di *conversione neoplastica* caratterizzata dalla modificazione del DNA cellulare ed una di *sviluppo neoplastico* nella quale le cellule alterate si moltiplicano fino ad originare la neoplasia vera e propria.

Un'altro modo per descrivere il meccanismo della cancerogenesi è quello di suddividerla in tre stadi:

- **iniziazione:** è una alterazione iniziale del DNA di un gruppo di cellule, che può avvenire spontaneamente o in seguito ad una esposizione ad un cancerogeno, e presuppone un'alterazione irreversibile in seguito alla quale sono comunque possibili

- la riparazione o, più frequentemente, la morte delle cellule coinvolte;
- promozione: è dovuta a sostanze che agiscono promuovendo lo stato di iniziazione (senza agire in nessun modo sul DNA); è però necessaria un'esposizione prolungata al promoter stesso perché si verifichi il fenomeno. Si tratta di un evento reversibile, in quanto se cessa l'esposizione al promoter il processo si ferma. Le sostanze implicate sono quelle sostanze in grado di attivare tutta una serie di meccanismi che aumentano il tasso di riproduzione, quasi sempre rappresentate da induttori enzimatici quali fenobarbitale, diossina, androgeni ed estrogeni.
 - Progressione: è la vera e propria manifestazione della trasformazione neoplastica delle cellule.

In seguito all'azione di un cancerogeno genotossico il DNA viene danneggiato e l'evenienza più pericolosa è quella che si formi un legame covalente. Ci possono essere rotture, scambi tra cromatidi, ecc. In seguito a questo si forma una nuova struttura che viene detta *addotto*, a questo punto il danno può essere riparato o meno e in questo caso la morte cellulare costituisce l'evenienza più favorevole.

Ci sono degli enzimi che sono deputati alla riparazione dei danni (questi sono presenti in quanto i danni possono avvenire anche spontaneamente e quindi la natura ha previsto un meccanismo di riparazione).

Se invece il DNA alterato si replica si possono verificare: morte cellulare, riparazione o mutazione che è una alterazione permanente. In seguito alla mutazione poi si possono verificare ulteriori alterazioni quali morte cellulare, instaurazione di forme silenti (non manifeste) o sviluppo di una possibile neoplasia. La trasformazione neoplastica (che non è ancora un tumore ma è uno stadio di quasi non ritorno) è determinata dall'attivazione dei *protooncogeni* o dall'inattivazione di *TSP (tumor suppressor protein)*. I protooncogeni sono dei geni normalmente presenti nelle cellule che codificano per proteine che stimolano la riproduzione cellulare incrementando la mitosi. Un aumento transitorio dell'attività dei protooncogeni di verifica durante l'embriogenesi, la riparazione tissutale e durante l'azione di alcuni ormoni (come per esempio gli ormoni steroidei). Molti cancerogeni genotossici come l'aflatossina B₁ provocano una mutazione dei protooncogeni che si trasformano in oncogeni. Uno dei più importanti è l'oncogene *ras* che determina l'attivazione di meccanismi biochimici che favoriscono la moltiplicazione cellulare in modo abnorme, incontrollato e quando non ce n'è bisogno.

I geni soppressori di tumori invece codificano per proteine che inibiscono la moltiplicazione cellulare. In condizioni normali esplicano tale attività, ma se subiscono una mutazione (sempre ad opera di cancerogeni) la proteina sintetizzata non è più efficace. Il gene più noto dotato di tali caratteristiche è detto p53; esistono individui caratterizzati dal possedere forme mutanti di p53 e quindi predisposti a determinati tipi di neoplasie.

Secondo lo IARC (organismo con sede a Lione e che a livello mondiale si occupa della classificazione degli agenti cancerogeni) si possono distinguere:

- cancerogeni certi: ci sono evidenze sperimentali sicure sia nell'uomo che negli animali. Es. arsenico (si può ancora usare come auxinico, anche se nessuno è mai riuscito a provocare neoplasie sperimentali da As in animali da laboratorio), aflatossine, DES (dietilstilbestrolo), benzene (fa parte della benzina verde ed è un leucemogeno), PVC (pellicole usate per la protezione di molte preparazioni alimentari oramai fuori legge).

- cancerogeni probabili: il loro effetto è limitato sull'uomo ma sufficiente per gli animali. Es. PCB, DEN (dietilnitrosamina)
- cancerogeni possibili: es. TCDD (tetraclorodibenzodiossina).
- cancerogeni non classificabili: presentano evidenze sporadiche e contrastanti. Es. diazepam (valium).
- sostanze probabilmente non cancerogene.

A seconda del loro meccanismo d'azione, i cancerogeni di origine chimica si possono dividere in :

a) cancerogeni genotossici

b) cancerogeni epigenetici

I cancerogeni genotossici reagiscono direttamente con il DNA cellulare e quindi possiedono proprietà mutagene. All'interno di tale gruppo di sostanze distinguiamo ancora i cancerogeni *diretti* o *primari*, che agiscono come tali, senza attivazione metabolica, ed i *procancerogeni* che invece necessitano di attivazione metabolica e spesso determinano il tumore in quei tessuti dove vengono bioattivati (es: AFB1 – fegato, DEN – esofago, stomaco).

I cancerogeni epigenetici non posseggono invece alcuna azione sul DNA, ma sono in grado di determinare la formazione della neoplasia per mezzo di :

- * effetti citotossici susseguenti a danno tissutale cronico: in seguito ad esposizioni prolungate nel tempo (anni) si hanno effetti citolesivi ed istolsivi (es: amianto o asbesto portano alla formazione di mesoteliomi incurabili con un tempo di incubazione lunghissimo);
- * azioni ormono-simili, date da sostanze in grado di legarsi ai recettori citoplasmatici e di determinare l'aumento dell'RNAm e quindi della sintesi proteica (es: androgeni o anabolizzanti propriamente detti, estrogeni e progestinici);
- * formazione di specie particolarmente reattive;
- * un' azione "promovente" (c.d. promoter) nei confronti di cellule neoplastiche esistenti allo stadio silente, esplicata da molecole che, con meccanismo non sempre chiaro, stimolano la replicazione di cellule tumorali già sottoposte ad iniziazione (es: induttori enzimatici come il fenobarbitale, i PCB, la diossina).

I cancerogeni epigenetici agiscono quindi soprattutto sul secondo stadio della genesi delle neoplasie indotte da xenobiotici, il c.d. "sviluppo".

Il rischio che il consumatore possa introdurre con la dieta residui di sostanze cancerogene non è da sottovalutare.

Le categorie di composti che più ci interessano sotto questo punto di vista sono le seguenti :

- * farmaci ad uso veterinario
- * molecole impiegate come "promotori di crescita"
- * contaminanti ambientali e biocontaminanti
- * residui aggiunti
- * residui neoformati

Per quanto riguarda i farmaci ad uso veterinario, il rischio è al giorno d'oggi relativamente ridotto specialmente alla luce delle legislazioni vigenti, in quanto viene imposta l'esecuzione di indagini tossicologiche volte, tra l'altro, ad evidenziare l'eventuale effetto cancerogeno della molecola oggetto di studio. Uno dei test di screening *in vitro* più importante per l'evidenziazione dei cancerogeni genotossici (e mutageni) è il **test di Ames o di mutagenesi**, nel corso del quale vengono impiegati alcuni ceppi mutanti di *Salmonella*

typhimurium che hanno perso la capacità di riprodursi in un medium privo di istidina, in quanto geneticamente privi della possibilità di sintetizzare tale aminoacido. La prova consiste nel verificare se la sostanza in esame, come tale o dopo aver subito un processo di eventuale bioattivazione a seguito di incubazione con frazione S-9 di ratto (frazione post-mitocondriale, ottenuta da un omogenato di fegato, contenente gli enzimi farmacometabolizzanti ossidativi e coniugativi), può indurre mutazioni in grado di far riacquistare ai suddetti ceppi di *Salmonella* la capacità di crescita in un medium privo di istidina. La frazione S-9 ci permette di discriminare se si tratta di un mutageno o di un promutageno. Per verificare il tasso di mutazioni spontanee si mette in incubazione anche una coltura di *Salmonella* a cui non è stata aggiunta la sostanza in esame. Si tratta di un test molto sensibile ma occorre sottolineare che il 70-80% delle sostanze che risultano positive, non risultano cancerogene ai test "in vivo". Può sembrare un test banale ma è universalmente accettato ed è valido ancora adesso nonostante sia nato intorno agli anni '80. Dopo il test di Ames si eseguono indagini più selettive per verificare la eventuale cancerogenicità "in vivo". Sempre in merito ai farmaci veterinari, occorre tuttavia sottolineare come, fino a pochi anni addietro, erano liberamente in commercio preparazioni c.d. "ricostituenti" contenenti composti sicuramente cancerogeni quali l'anidride arseniosa in grado di accumularsi soprattutto nei parenchimi epatico e renale. Un pericolo maggiore sembra provenire da molecole a tutt'oggi illegalmente usate a scopo auxinico soprattutto nei bovini, quali il DES ed altri derivati stilbenici, cancerogeni completi (epigenetici e genotossici) capaci di indurre in specie da laboratorio e nell'uomo la formazione di neoplasie dell'apparato genitale femminile trasmissibili alla progenie. Molto dibattuta è la possibile attività cancerogena di tutti i promotori di crescita dotati di attività ormonale (estrogeni naturali, steroidi anabolizzanti, zeranol); indipendentemente da considerazioni di carattere meramente legale, occorre sottolineare che praticamente la totalità di tali composti ha dimostrato un'attività tumorigenica (di tipo epigenetico ed in qualche caso anche genotossico) nel corso di sperimentazioni a lungo termine.

Fra i contaminanti ambientali, ricordiamo gli alogenoderivati organici (PCB ed altri organoclorurati), che agirebbero soprattutto con meccanismo epigenetico in qualità di "promoter".

Di estremo interesse fra i biocontaminanti sono le micotossine, ed in particolare la già menzionata aflatossina B₁ (AFB₁) che è considerato il cancerogeno più potente ad elettivo tropismo epatico. Tale micotossina può contaminare soprattutto alimenti di origine vegetale (panelli di arachidi e di lino) usati per l'alimentazione del bestiame. AFB₁ ed il suo metabolita idrossilato M₁ si riscontrano in muscoli e visceri di suino e, soprattutto, nel latte. L'aflatossina è un *pro-cancerogeno genotossico* che subisce una bio-attivazione da parte dei sistemi enzimatici P₄₅₀-dipendenti per formare un epossido in grado di legarsi all'atomo di azoto in posizione 7 della guanina del DNA originando un complesso (definito "addotto") stabile. Nonostante l'elevatissimo potere cancerogeno, studi epidemiologici recenti affermano che il rischio di epatocarcinomi nella popolazione umana legato all'assunzione di tale micotossina sarebbe relativamente basso, valutabile intorno ad 1/1000 a fronte di un'esposizione costante a 10.6 ng/kg p.v./giorno di AFB₁. Anche l'ocratossina A, caratterizzata da proprietà spiccatamente nefrotossiche, risulterebbe implicata nella genesi di carcinomi renali.

Per quanto concerne i residui aggiunti, alcuni additivi hanno dimostrato potere cancerogeno. Fra questi, ricordiamo il safrolo, *pro-cancerogeno genotossico*, molecole ad azione antiossidante quali il butilidrossianisolo (BHA) ed il butilossitoluene (BHT), entrambi

cancerogeni epigenetici.

Importantissime, fra i residui neoformati sono le nitrosamine (NA), originate (fra gli altri fattori) anche dalla reazione di nitrati e nitriti (additivi) con amine secondarie, terziarie e quaternarie naturalmente presenti nelle carni ed in altri alimenti di origine animale. Condizioni di pH acido e la cottura (che libererebbe aminoacidi ed altre amine facilmente nitrosabili) favorirebbero la formazione di NA. Le NA agiscono come *pro-cancerogeni genotossici* in quanto un loro metabolita ossidato si lega al DNA con un meccanismo simile a quello delle AF. Studi epidemiologici condotti in Emilia-Romagna su individui di una zona rurale rivelerebbero una correlazione altamente positiva fra concentrazioni urinarie di nitrati e nitriti e mortalità dovuta a neoplasie maligne allo stomaco; un ruolo importante potrebbe essere giocato dall'alimentazione, tradizionalmente ricca di insaccati in quelle regioni.

4) Effetti mutageni. E' definito mutageno uno xenobiotico capace di interagire in modo diretto o indiretto con gli acidi nucleici. Poiché tale azione è propria dei cancerogeni genotossici, molti dei concetti generali esposti al punto precedente sono applicabili anche per le sostanze ad attività mutagena.

Alcuni xenobiotici, come le AF, sono dotati di entrambe le azioni, ma tale sovrapposizione non sempre è così assoluta essendo stata stimata in poco più dell'80% (l'80% dei mutageni per fortuna non sono cancerogeni). La valutazione rapida (5 giorni) dell'eventuale attività mutagena di un composto, che di norma precede i test a lungo termine di cancerogenicità, si avvale di sistemi metabolici bio-attivanti e viene valutata su cellule procariote (es. *Salmonella spp*), eucariote (es. *Saccharomyces cerevisiae*) o su colture cellulari in linea (più affidabile). Un tipo di test *in vivo* è il c.d. host mediated assay, nel quale gli stessi agenti utilizzati nelle prove *in vitro* (batteri e lieviti) vengono impiantati generalmente nella cavità orale di animali sperimentali esposti allo xenobiotico del quale si vogliono esaminare le eventuali proprietà mutagene. Dopo un certo tempo si procede al sacrificio dell'animale e si recuperano i microrganismi precedentemente impiantati. La valutazione del potere mutageno si basa sull'esame dei danni a livello meiotico (ricombinazione, ecc.) o mitotico (conversione genica, crossing over) e deve tener conto delle mutazioni spontanee che si verificano anche in condizioni normali. Pertanto, vengono classificate come mutagene quelle molecole che, in diversi test, provocano il raddoppio del numero degli individui mutanti.

Gli xenobiotici ad attività mutagena sono molto numerosi. Ricordiamo alcune tossine presenti nei vegetali, come gli alcaloidi pirrolizidinici contenuti nel genere *Senecio* che possono contaminare il latte ed il miele.

Fra i biocontaminanti una posizione di rilievo è occupata dalle micotossine; oltre alle già menzionate AF ed ai loro metaboliti, anche l'ocratossina A, la patulina, la tossina T-2, l'acido ciclopiazonico e lo zearalenone (per citare soltanto le più note) posseggono elevata attività mutagena.

Per quanto concerne i residui aggiunti, esistono evidenze sperimentali parziali per alcuni additivi (acidi formico e benzoico, ortofenilfenolo, biossido di solfo).

Fra i residui neoformati, sicura attività mutagena è stata dimostrata per le nitrosamine e per alcuni prodotti originati dall'affumicamento, fra i quali gli idrocarburi aromatici policiclici come il benzo(a)pirene. Anche la cottura degli alimenti dà origine a molecole a spiccata attività mutagena. Ricerche condotte negli anni '80 avevano infatti dimostrato la presenza di mutageni in estratti di carne bovina arrostita alla griglia; la quantità di tali prodotti era

proporzionale al contenuto proteico. Soltanto successivamente sono stati identificati i prodotti mutageni ottenuti applicando $T^{\circ} > 300^{\circ}C$ a numerosi aminoacidi. Ancora più recentemente si è scoperto che sottoponendo carni, pesci e uova a T° anche inferiori ($200^{\circ}C$) si ottenevano alcune amine eterocicliche (denominate IQ, MeIQ, MeIQx) il cui potere mutageno è il più alto finora conosciuto, essendo circa 100 volte maggiore di quello dell'AFB₁.

5) Effetti teratogeni. E' definita teratogena una molecola capace di produrre effetti tossici sull'embrione o sul feto in un determinato periodo di gestazione denominato periodo critico corrispondente all'organogenesi.

È importante considerare che l'agente teratogeno agisce sempre in maniera specifica nei confronti di un determinato organo e solo su quello e che al di fuori del periodo critico non ha più nessun effetto.

La tragedia del talidomide, un farmaco che veniva prescritto alle donne in gravidanza e che ha provocato la nascita di decine di bimbi focomelici (focomelia = arti simili a quelli delle foche per mancata formazione dei segmenti intermedi), è il classico esempio di come le prove di teratogenicità debbano essere eseguite su specie diverse. Nel caso del talidomide, infatti, si è dimostrato che il metabolita caratterizzato da attività teratogena (un arene ossido) viene prodotto, ad esempio, nel coniglio ma non nel ratto.

Per quanto concerne il rischio teratogenico da residui, i dati in nostro possesso sono piuttosto scarsi e riguardano in modo particolare i farmaci. Fra questi, attività teratogena è stata riscontrata per alcuni antelmintici benzimidazolici (ABZ), composti intensamente usati in veterinaria, i residui dei quali (unitamente a quelli dei metaboliti) si ritrovano anche nel latte. La *pecora* risulta la specie più colpita, in quanto sensibile a parbendazolo, cambendazolo, oxfendazolo, albendazolo, febantel ed insensibile a fenbendazolo, oxibendazolo e mebendazolo. Ciascuno di questi composti è responsabile di malformazioni scheletriche (deformità degli arti, flessioni carpali). Il *bovino*, invece, non sembra sensibile agli effetti teratogeni degli ABZ, probabilmente per la metabolizzazione epatica qualitativamente diversa cui vanno incontro tali molecole in questa specie (cfr. paragrafo sulle biotrasformazioni).

Studi approfonditi sulla teratogenicità degli ABZ hanno messo in luce la pericolosità dei residui estraibili al confronto di quelli persistenti.

Anche il DES, se assunto da donne in gravidanza, può comportare delle malformazioni a carico dell'apparato genitale maschile (ipoplasia testicolare). Principi teratogeni sono infine contenuti in molte piante tossiche come il *Veratrum coliforniani* (?) (ciclopia).

Nonostante la comprensibile gravità legata al rischio di assumere residui di molecole ad azione teratogena, occorre sottolineare che, a differenza degli effetti mutageni e cancerogeni, la teratogenicità di una molecola è strettamente dose-dipendente. E' quindi possibile stabilire una dose massima tollerabile negli alimenti ragionevolmente priva di rischi.

Ai **rischi indiretti** appartiene il fenomeno dell' **antibiotico-resistenza** (AR). Si tratta di un fenomeno complesso per il quale alcuni ceppi batterici, in particolar modo alcune specie componenti la flora batterica intestinale, acquisiscono la proprietà di risultare insensibili all'azione di molti farmaci antibatterici. L'AR è originata da un fattore di resistenza (fattore R), costituito da un plasmide (organulo contenente molecole di DNA presente nel citoplasma batterico) il quale opera nei seguenti modi:

- * codifica la sintesi di enzimi inattivanti un certo numero di antibatterici;
- * diminuisce la permeabilità della parete cellulare nei confronti degli stessi;
- * diminuisce l'affinità dei farmaci verso i siti di legame nella cellula batterica.

Esistono elementi mobili nell'ambito dei plasmidi, detti trasposoni e costituiti anch'essi da DNA, capaci di trasferirsi in un plasmide di un'altra cellula batterica. Poiché per solito un plasmide è vettore della resistenza verso più antibatterici, è evidente la possibilità, almeno teorica, che un germe sviluppi AR verso un cospicuo numero di farmaci. La frequenza della migrazione dei trasposoni è piuttosto bassa e, nell'ambito di una popolazione, soltanto un limitato numero di batteri può acquisire il carattere di AR. La presenza di un antibiotico, tuttavia, tende a selezionare le forme antibiotico-resistenti in quanto riduce drasticamente il numero dei batteri non dotati di AR. Per tale motivo, l'additivazione dei mangimi con dosi sub-terapeutiche di antibiotici e chemioterapici è stata ritenuta responsabile della selezione di ceppi batterici caratterizzati da AR i quali perverrebbero all'uomo soprattutto attraverso gli alimenti carnei (contaminati soprattutto durante l'eviscerazione delle carcasse), ma anche attraverso il consumo di latte e uova. In caso di assunzione di antibiotici a scopo terapeutico, la rapida proliferazione di forme AR può comportare il rischio di gravi patologie anche mortali, particolarmente in individui giovani o molto anziani od immunodepressi. Fra le specie batteriche particolarmente suscettibili di contrarre AR ricordiamo *Salmonella typhimurium*, *S. dublin*, *S. newport* e numerosi sierotipi di *E. coli*.

Una quantificazione delle dimensioni del problema è piuttosto ardua e, d'altra parte, l'uso degli antibiotici e chemioterapici quali promotori di crescita negli animali da reddito è pratica ormai invalsa da tempo negli allevamenti a causa degli indubbi benefici economici.

Circa la pericolosità dei residui di antibatterici negli alimenti di origine animale quali cause di A.R. esistono quindi due linee di pensiero sostanzialmente antitetiche; da un lato, si tende a conferire al fenomeno un carattere di marginalità, sostenendo inoltre che le basse dosi di antibatterici non originerebbero AR poiché, in tal caso, detti trattamenti perderebbero totalmente la loro efficacia. Altri ricercatori sostengono invece che la pratica dell'additivazione dei mangimi sia una delle cause principali dell'AR. Secondo tali studiosi, il fattore R è realmente in grado di essere trasferito a ceppi patogeni di *Salmonella*, non soltanto secondo la direzione animale ---> uomo ma anche viceversa, cioè uomo ---> animale. Fra le preparazioni alimentari carnee maggiormente implicate vi sarebbero gli hamburger e le bistecche "al sangue".

VALUTAZIONE DEL RISCHIO TOSSICOLOGICO DA RESIDUI NEGLI ALIMENTI DI O.A.

La legislazione dei diversi paesi europei sul rischio tossicologico legato all'assunzione di residui negli alimenti ha subito nel corso degli anni una notevole evoluzione per diversi motivi:

1. la messa a punto di test di tossicità sempre più rapidi, sensibili ed affidabili;
2. la necessità di soddisfare contemporaneamente due esigenze contrastanti: la produzione di alimenti salubri da un lato e dall'altro l'impossibilità di sviluppare in breve tempo metodi di allevamento intensivi limitando drasticamente l'uso dei farmaci;
3. la pressione esercitata dell'opinione pubblica e da movimenti dei consumatori per privilegiare la produzione delle derrate alimentari di O.A. dal punto di vista qualitativo (assenza di residui) rispetto quello quantitativo.

Negli anni passati le legislazioni europee, inclusa quella italiana, non ammettevano la presenza di residui di xenobiotici (in particolare modo farmaci) nelle derrate di O.A. richiedendo il c.d. "residuo zero". Recentemente, tale orientamento è stato abbandonato in quanto:

1. è impossibile rilevare "l'assenza" di residui negli alimenti, poiché essa varia in rapporto allo sviluppo di tecniche di indagine analitica, sempre più sensibili, sofisticate e capaci di misurare quantità sempre più piccole (ppt o ng/kg);
2. diverse molecole, messe sotto accusa per la loro pericolosità, sono naturalmente presenti negli alimenti o si formano in seguito all'impiego di processi fisici (es. uso del calore per l'affumicamento o la cottura) e la loro presenza non può essere evitata.

Pertanto, le legislazioni attualmente vigenti, compresa quella della Comunità Europea (CEE) in materia di residui non considera più il "c.d. residuo zero" ma "l'assenza di residui che possano implicare un rischio per la salute del consumatore.

Come conseguenza, almeno per alcune molecole, è stata accettata la presenza di una quantità di residuo (ADI o dose giornaliera tollerata) la cui assunzione giornaliera per tutta la vita sia priva di effetti indesiderati.

A tal proposito sono state emanate una serie di norme per codificare alcune procedure sperimentali intese ad evidenziare i valori di ADI per alcuni xenobiotici (farmaci, contaminanti ambientali, fitofarmaci, ec..).

L'insieme di tali norme si basa su alcuni postulati fondamentali:

- a. la tossicità di uno xenobiotico di norma è in funzione della dose;
- b. la valutazione della tossicità viene effettuata prevalentemente mediante studi "in vivo";
- c. per la variabilità interspecifica è necessaria una sperimentazione in più specie animali;
- d. l'estrapolazione dei dati tossicologici ottenuti negli animali da laboratorio all'uomo, pur discutibile, attualmente costituisce l'unico sistema valido per la valutazione del rischio tossicologico da residui presenti negli alimenti.

Per potere giungere alla quantificazione dell'ADI è necessario come punto di partenza determinare il **NOEL (no observed effect level) o NOAEL (no observed adverse effect level)**, che rappresenta la quantità di uno xenobiotico che non dà luogo ad effetti biologici apprezzabili (modificazioni fisiologiche: alterazioni della crasi ematica, aumento in peso di

un organo, significativo decremento ponderale, ec..) se somministrato nella dieta ad animali da laboratorio per lunghi periodi di tempo (intera vita biologica o emivita biologica). Questo viene misurato in ppm (mg/kg di dieta).

Le notevoli variazioni interspecifiche impongono che la valutazione dei NOEL nello studio della sensibilità agli effetti tossici degli xenobiotici sia effettuata nella specie animale più sensibile. Dal punto di vista legislativo generalmente sono sufficienti due specie, delle quali una non appartenente ai roditori (es. ratto e cane); tuttavia, nel corso della sperimentazione, pur individuando tra le due specie quella più sensibile, certamente quest'ultima potrebbe non esserlo in senso assoluto per le notevoli differenze metaboliche fra le specie di laboratorio e quelle di interesse zootecnico o per la formazione di metaboliti, causa di determinati effetti tossici.

Pertanto, la procedura attualmente adottata per la determinazione del NOEL potrebbe portare a risultati non sempre estrapolabili all'uomo.

Dopo avere determinato il NOEL per la specie più sensibile, si può trasformare tale valore in **ADI animale (acceptable daily intake)** o **DGA (dose giornaliera accettabile)**, che rappresenta la quantità di xenobiotico (per kg di peso vivo) che può essere assunta per tutta la vita dell'animale senza la comparsa di effetti biologici.

Esempio:

NOEL di un composto nella specie più sensibile (ratto) = 100 ppm (mg/Kg) nella dieta,

*poiché il consumo medio giornaliero di cibo/ratto adulto di 200 g = 15 g,
l'animale giornalmente introdurrà 1.5 mg di composto ogni 200 g di peso corporeo,
pari a 7.5 mg/kg di peso corporeo, che corrisponde al valore di ADI-animale*

L'**ADI-uomo**, si ottiene dividendo l'ADI-animale per un fattore di abbattimento che si considera pari a 100, che deriva dal prodotto di 10 (che tiene conto della variabilità interspecifica) moltiplicato 10 (variabilità intraspecifica).

$$\text{ADI-uomo} = \frac{\text{ADI-animale}}{\text{Fattore abbattimento (pari a 100)}}$$

Si ipotizza praticamente che l'uomo sia 10 volte più sensibile della specie animale sulla quale è stata condotta la sperimentazione e che nell'ambito della stessa specie umana, la sensibilità possa variare fino a 10 volte. Nonostante siano stati presi in considerazione questi fattori cautelativi, è stato dimostrato per alcuni composti (xenobiotici) una variabilità nella sensibilità inter- ed intraspecifica superiore a 10.

Il fattore di abbattimento 100 viene considerato insufficiente quando la sperimentazione di una molecola risulta lacunosa ed incompleta (es. ridotto numero di animali) o quando sono stati evidenziati effetti teratogeni e cancerogeni. In questi casi, si utilizzano fattori più elevati pari a 200, 500, 1000 e 2000.

Nel caso di residui farmacologici, se si possono utilizzare dati disponibili sulle prove cliniche condotte sull'uomo, si può applicare un fattore di abbattimento più basso (per es. 10).

Per i cancerogeni genotossici, in linea generale, non è possibile applicare alcun fattore di abbattimento in quanto non dovrebbero essere presenti nelle derrate alimentari.

Ritornando all'esempio sopra citato avremo:

$$\text{ADI uomo} = \frac{7.5 \text{ mg/kg (ADI-animale)}}{100 \text{ (Fattore di abbattimento)}} = 0.075 \text{ mg/kg}$$

pari a 5.25 mg/giorno per un uomo adulto di peso medio di 70 kg.

Tale quantità va ripartita nel pacchetto alimentare assunto giornalmente dall'uomo, che è ovviamente sovrastimato, per abbattere ulteriormente il rischio tossicologico, risultando composto da:

- 300g di muscolo;
- 100g di fegato;
- 50g di rene (grandi animali) o 10g di rene (pollo);
- 50g di grasso (grandi animali, per il suino grasso e pelle) o 90g di grasso e pelle (pollo);
- 1500g di latte;
- 100g uova;
- 20g miele.

Tale ripartizione viene effettuata sulla base delle caratteristiche cinetiche del farmaco (attestate da studi di deplezione residuale effettuati sui vari tessuti considerati, nella specie di destinazione), e porta alla determinazione dell'**MRL (maximum residue limit)** o **LMR (limite massimo residuale)** cioè la concentrazione massima di residui di un determinato farmaco e/o dei suoi metaboliti ammessa in un dato tessuto animale, nel latte e nelle uova.

L'applicazione di adeguati **tempi di sospensione** (tempo che deve intercorrere tra l'ultima somministrazione del medicinale veterinario e l'ottenimento di prodotti alimentari che non contengono residui in quantità superiori ai limiti massimi fissati), garantisce al consumatore l'assunzione di derivati alimentari scevre da rischi.