

I N T E R F E R E N T I E N D O C R I N I

SCHEDA MONOGRAFICHE

6 Clorpirifos e clorpirifos-metile

Roberta Turci¹, Elena Sturchio², Jessica Businaro³, Laura Casorri², Marcello Imbriani^{3,4}, Claudio Minoia¹

¹ Laboratorio di Misure Ambientali e Tossicologiche, "Fondazione Salvatore Maugeri", IRCCS, Pavia

² INAIL DIPIA, ex ISPESL, Roma (Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro, Dipartimento Installazioni di Produzione e Inseguimenti Antropici, ex Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro, Roma)

³ Unità Operativa Ospedaliera di Medicina del Lavoro (UOOML), "Fondazione Salvatore Maugeri", IRCCS, Pavia e Cattedra di Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Pavia

⁴ Ordinario di Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Pavia, Direttore Scientifico Fondazione S. Maugeri, IRCCS, Presidente Associazione Lombarda di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale

Premessa

Il clorpirifos appartiene alla famiglia dei pesticidi organofosforici (OP), che rappresentano circa il 40% dei pesticidi registrati per uso commerciale negli Stati Uniti. In Europa è ampiamente utilizzato, soprattutto in Italia e in Spagna, in agricoltura, nella disinfestazione e nel giardinaggio.

Questi pesticidi di origine sintetica sono generalmente esteri, ammidi o tioli di derivati di acidi fosforici, fosfonici, fosforotioici o fosfonotioici. Gli esteri OP derivano dall'acido fosforico o tiofosforico e sono utilizzati in agricoltura come insetticidi. Alcuni OP (ad esempio il glifosate) vengono utilizzati anche come erbicidi. Gli OP ad azione diserbante tuttavia differiscono per alcune caratteristiche chimico-fisiche dagli OP utilizzati come insetticidi.

Questi composti sono caratterizzati da una ridotta capacità di inibire in maniera significativa l'enzima acetilcolinesterasi (AChE). Di conseguenza, gli episodi di intossicazione acuta sono meno frequenti e la gravità delle reazioni avverse è minore.

Oltre all'esposizione a OP legata all'impiego lavorativo, si può verificare frequentemente un'esposizione accidentale, soprattutto nelle realtà produttive agricole a conduzione familiare, in cui non vengano rispettate le norme igieniche e di sicurezza. Gli OP, a causa della loro liposolubilità, sono assorbiti principalmente per via percutanea. Possono essere assorbiti anche per via inalatoria (nel caso di polveri e aerosol) e per via digestiva. In quest'ultimo caso si tratta spesso di ingestioni accidentali o volontarie a scopo suicida. In generale gli OP sono eliminati rapidamente (possiedono infatti un'emivita di poche ore), con alcune eccezioni tra cui il clorpirifos (CPF) che possiede un'emivita di durata maggiore.

1. Identità e caratteristiche chimico-fisiche

Il CPF ed il metil-clorpirifos (m-CPF) sono insetticidi organofosforici di contatto ad ampio spettro, largamente

impiegati in agricoltura e per uso domestico. La loro neurotossicità è associata all'inibizione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE) che controlla i livelli del neurotrasmettitore acetilcolina nel sistema nervoso centrale e periferico.

Il CPF è un solido granulare marrone chiaro leggermente aromatico, scarsamente solubile in acqua e molto solubile in solventi organici. Si decompone rapidamente se sottoposto a temperature superiori a 160°C.

Il m-CPF è un solido cristallino bianco con un lieve odore di mercaptano. È scarsamente solubile in acqua e moderatamente solubile in esano e alcoli, e molto solubile in altri solventi organici (acetone, benzene e cloroformio). Viene rapidamente idrolizzato ad elevati valori di pH e si decompone rapidamente per fotodecomposizione in luce UV.

In Tabella 1 sono riportati le principali caratteristiche e i parametri chimico-fisici di CPF e m-CPF.

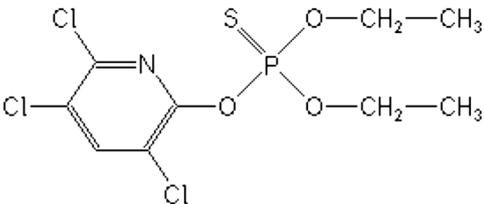
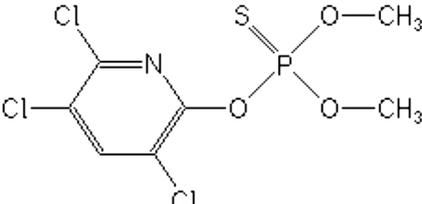
2. Utilizzo e diffusione nell'ambiente

Nonostante i benefici apparenti conseguenti all'uso dei pesticidi OP (agricoltura, disinfestazioni domestiche e uso del di-isopropanil fluorofosfato come inibitore della colinesterasi oftalmica nella cura del glaucoma), gli episodi di avvelenamento conseguenti al loro utilizzo sono sempre più frequenti, soprattutto nelle zone rurali, e rappresentano la causa più importante di grave tossicità e morte per intossicazione acuta in tutto il mondo, con più di 200.000 decessi all'anno nei paesi in via di sviluppo (Eddleston 2000).

L'uso domestico e agricolo di questi pesticidi può causare intossicazione acuta e, poiché è difficile effettuare una correlazione tra dose ed effetti della tossicità, ciascuna esposizione richiede un'analisi approfondita (Roberts et al. 2005).

L'avvelenamento può avvenire anche per contaminazione accidentale da fonti domestiche, ad esempio

Tabella 1. Identità chimica e proprietà chimico-fisiche del Clorpirifos e del Clorpirifos-metile

Identità chimica	<i>Clorpirifos</i>	<i>Clorpirifos-metile</i>
Nome IUPAC	O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato	O,O-dimetil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato
Altri nomi	acido fosforotioico, O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) estere; clorpirifos-etile; clorpirifos	acido fosforotioico, O,O-dimetil O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) estere; clorpirifos-metile;
Formula bruta	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS
Struttura chimica		
CAS	2921-88-2	5598-13-0
NIOSH RTECS	TF6300000	-
EINECS	220-864-4	227-011-5
EU index nr.	015-084-00-4	-
Peso molecolare	322,57	322,53
Aspetto	solido cristallino bianco o ambrato	solido cristallino giallo pallido
Densità	1,398 g/ml	1,67 g/ml
Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (Log K _{ow})	4,82	4,00
Punto di fusione	41-42°C	46°C
Punto di ebollizione	decompone a circa 160°C	360°C
Solubilità in acqua a 20°C	0,7 mg/L	2,74 mg/L
Solubilità in solventi organici	79% in peso in isotano 43% in peso in metanolo si scioglie rapidamente in altri solventi	250 mg/L in acetato di etile e acetone 154 mg/L in eptano 193 mg/L in metanolo
Tensione di vapore	1,87x10 ⁻⁵ mmHg (20°C)	4,2 x10 ⁻⁵ mmHg (25°C)
Fraresi di rischio	R24/25 - R50/53	-
Fraresi di sicurezza	-	-

bambini e adulti che vengono in contatto con pesticidi conservati in modo improprio in casa, in garage o in capanni da giardino, con esche per scarafaggi e altri insetti (CPF), shampoo contro i pidocchi (malathion), preparati per animali domestici (saponi, collari).

Uno studio condotto nel 1998 ha inoltre evidenziato che il CPF si può accumulare in concentrazioni significative su giocattoli, pavimenti e su altre superfici assor-

benti causando per un bambino di età compresa tra i 3 e i 6 anni una possibile esposizione acuta di 365 µg/kg/giorno, molto al di sopra del livello di esposizione accettabile stabilito per un adulto (ADI = *acceptable daily intake* = 10 µg/kg/giorno).

Chensheng Lue et al. nel 2001 hanno valutato l'esposizione a pesticidi OP in bambini che vivono in due comunità dell'area metropolitana di Seattle, misurando i me-

taboliti urinari, e individuando i possibili fattori di rischio di esposizione mediante colloquio con i genitori. Quasi tutti i bambini in questo studio avevano nelle urine livelli misurabili di metaboliti dei pesticidi OP, alcuni dei quali probabilmente provenienti dalla dieta. Elevati livelli di metaboliti sono invece stati associati all'uso dei pesticidi in giardino. È improbabile che questi livelli di esposizione possano causare intossicazione acuta, ma non sono noti gli effetti sulla salute a lungo termine.

Chensheng Lu et al. nel 2004 hanno inoltre effettuato misure ambientali di pesticidi organofosforici nelle case di 13 bambini, che vivono sia nell'area metropolitana di Seattle, sia nella zona agricola dello Stato di Washington, per accertare eventuali differenze nell'esposizione. Ogni casa è stata sottoposta a campionamento per due periodi di 24 ore durante due stagioni, estate e autunno. I campioni esaminati sono stati l'aria interna, l'acqua potabile, il suolo, la polvere di casa, le mani, i giocattoli e la dieta. Almeno un pesticida è stato trovato in ciascuna delle matrici campione fatta eccezione per l'acqua potabile. La metà dei campioni di aria indoor conteneva livelli rilevabili di CPF e diazinone. Rilevabili livelli di diazinone e azinfosmetil sono stati trovati nella polvere della maggior parte delle case agricole, mentre solo il diazinone è stato trovato nelle case di Seattle in estate. Livelli quantificabili di CPF e azinfosmetil sono stati trovati sulle mani e sui giocattoli dei bambini esaminati nelle zone agricole. Questi risultati suggeriscono percorsi di esposizione differenti per bambini che vivono in regioni agricole e non agricole.

Suolo e piante

Il CPF viene introdotto nell'ambiente attraverso la sua applicazione diretta sulle colture e attraverso la volatilizzazione e lo smaltimento dei rifiuti che lo contengono. La maggior parte degli studi sulla persistenza del CPF nel suolo sono stati effettuati su terreni agricoli. Nel suolo il CPF ha una persistenza molto variabile a seconda del tipo di terreno, di clima e di altri fattori (Singh et al. 2003; Fang et al. 2008), non è mobile (alcuni ricercatori lo hanno classificato come "immobile"), ed è adsorbito e si lega fortemente alle particelle di terreno, non si miscela bene con l'acqua, per cui raramente si trova nei sistemi idrici locali.

Sono stati effettuati numerosi studi per determinare la persistenza del CPF nel suolo. In uno studio canadese residui di CPF sono stati rilevati in campioni di ravanella e di carota 2 anni dopo la sua applicazione, mentre un altro studio ha evidenziato residui di CPF in un terreno coltivato a cipolle dopo un anno dal trattamento. Poiché nei molti studi effettuati sulla persistenza del CPF non è mai stata determinata la sua completa scomparsa, non è possibile dare una risposta definitiva riguardo alla persistenza del CPF nel suolo. Sono stati effettuati molti

studi anche sui tempi di persistenza del CPF nei terreni di silvicoltura, ad esempio su di un terreno sabbioso della Florida è stata rilevata una persistenza di almeno un anno, mentre in una foresta di *Pinus taeda* nella Georgia la persistenza è stata di 15 mesi (USEPA 1999; Kamrin 1997; Roberts et al. 1999).

Il CPF persiste più lungamente a basse temperature (per ogni diminuzione della temperatura di 10 gradi raddoppia la relativa persistenza); inoltre le formulazioni granulari e microincapsulate sono più persistenti rispetto alle formulazioni liquide.

Nei suoli leggermente acidi (pH da 4 a 5), il CPF è più persistente rispetto ai suoli a pH più elevato (Kamrin 1997; Roberts et al. 1999). Il CPF e il m-CPF nell'ambiente sono degradati da luce UV, idrolisi chimica, dechlorurazione ed altri processi chimici, dai batteri del suolo e i costituenti del suolo e delle acque dei fiumi possono catalizzare la loro degradazione (Kamrin 1997).

I prodotti di degradazione di CPF e m-CPF sono formati attraverso dealchilazione ossidativa o idrolisi di dietil fosfati ed a 3,5,6 tricloro-2-piridinolo (TCP) (Roberts et al. 1999).

Il prodotto principale dell'idrolisi è il TCP che viene adsorbito debolmente dalle particelle del terreno, è moderatamente mobile e persistente ed infine viene trasformato in CO₂ (USEPA 1999; Kamrin 1997). Questa idrolisi è un processo che in circostanze normali è rapido, ma i residui del pesticida potrebbero persistere a lungo nel suolo o nel raccolto.

L'assunzione del TCP da parte delle piante dipende dal pH. Ad un pH ≥ 7 il piridinolo viene rapidamente trasformato in un sale solubile in acqua che entra nella pianta cinque volte più velocemente; durante questo processo viene rilasciato cloruro, con formazione di alcuni prodotti solubili in acqua non identificati.

In uno studio effettuato su sette terreni aerobici con struttura sabbiosa e argillosa ed un pH compreso tra 5,4 e 7,4, il periodo di persistenza del CPF variava da 11 a 141 giorni. Dopo 360 giorni sono stati rilevati nel suolo CO₂ (27-88%), TCP (fino a 22%) e piccole quantità di 3,5,6-tricloro-2-metossipiridina (TMP) (≤8%) (Kamrin 1997; Roberts et al. 1999). Nei terreni di media tessitura la persistenza del CPF variava da 33 a 56 giorni (Kamrin 1997).

Da diversi studi effettuati sul m-CPF sembra improbabile la lisciviazione di questi composti dal luogo di applicazione (www.fao.org). Le radici delle piante non assorbono direttamente il CPF dal terreno (Tomlin 2006). Benché un certo quantitativo di CPF possa essere assorbito dalle piante attraverso le superfici fogliari, alcuni studi hanno evidenziato che i residui di CPF persistono per 10-14 giorni dopo l'applicazione (Kamrin et al. 1997), gran parte viene perso per volatilizzazione, o desolfato in CPF-oxone sulla superficie delle piante (Roberts et al. 1999). Le piccolissime quan-

tà di CPF assorbite dai tessuti vegetali sono traslocate all'interno della pianta e metabolizzate in TCP che è immagazzinato come glicoside coniugato (Tomlin 2006; Roberts et al. 1999).

Nelle regioni del sud europa il m-CPF è largamente utilizzato negli agrumeti, nei vigneti ed in orticoltura per il controllo dei parassiti.

In Sicilia sono stati effettuati studi per valutare l'esposizione al m-CPF del terreno di un agrumeto e di un piccolo corpo d'acqua di superficie situato a 0,5-1,0 m dal campo. I valori di antiparassitario misurati nel campo dopo il trattamento erano compresi fra lo 0,04% e lo 0,19% della dose teorica applicata ed erano inferiori a quelli riscontrati in altri studi probabilmente a causa della velocità del vento e della sua variazione. Nei campioni raccolti subito dopo il trattamento dell'acqua di superficie adiacente al campo sono state rilevate concentrazioni di m-CPF comprese tra 0,05- 0,08 µg/l (Padovani et al. 2005).

Dagli studi condotti sull'effetto tossico del CPF sui microorganismi del suolo (Omar e Abdel-Sater 2001, Singh e al. 2002, Answer e al. 2009), è stato riscontrato che la presenza di CPF riduce il numero totale dei batteri, ma la popolazione fungina ed i batteri denitrificanti presentano invece un'elevata tolleranza a questo insetticida.

Alcuni studi hanno evidenziato un periodo di decomposizione del CPF più lungo in ambiente sterile rispetto alle condizioni naturali, evidenziando che le attività microbiche influenzano la sua degradazione nel suolo (Miles et al. 1984). La scissione dell'anello eterociclico è effettuata dai microorganismi (Racke & Coats 1990) che sono responsabili anche della sua degradazione in TCP e TMP (Racke 1993).

Nel 1975 Munnecke et al. hanno dimostrato per primi che in ambiente controllato la capacità del paratione idrolasi (enzima idrolitico degli esteri organofosforici), isolato da una coltura microbica mista, di idrolizzare il CPF.

Jones e Hastings (1981) hanno studiato il metabolismo di 50 ppm di CPF in colture fungine (*Trichoderma harzianum*, *Penicillium vermiculatum* e *Mucor sp.*). Dopo 28 giorni dal trattamento, il CPF ed il suo metabolita TCP erano presenti in tutte le colture ai livelli rispettivamente del 2-5% e dell'1-14%.

Ivashina (1986) ha osservato che la degradazione del CPF in colture liquide trattate con 10 ppm di pesticida, era più rapida in quelle contenenti *Trichoderma sp.* e *Bacillus sp.* rispetto al controllo privo di microorganismi.

Lal e Lal (1987) hanno dimostrato che in colture di *Saccharomyces cerevisiae* dopo 12 h dal trattamento con 1-10 ppm di CPF veniva ritrovato solo metà del pesticida iniziale.

Feng et al. nel 1998 hanno isolato per la prima volta una coltura pura di *Pseudomonas sp.* in grado di utilizzare

il TCP come unica fonte di carbonio e di energia in condizioni aerobiche, i cui prodotti di degradazione erano CO₂, cloruro ed alcuni metaboliti polari non identificati.

L'isolamento e la caratterizzazione dei microorganismi (principalmente batteri e funghi) che degradano i pesticidi è importante per comprenderne i meccanismi ed i loro effetti sull'ambiente e per poterli utilizzare nella biodegradazione del CPF (Kumar et al. 2007).

Acqua

Il CPF non liscivia facilmente dal terreno all'acqua; di conseguenza, quello trovato nell'acqua di scorrimento probabilmente proviene dall'erosione del suolo a cui si lega (*Reregistration Eligibility Science Chapter for Chlorpyrifos Fate and Environmental Risk Assessment Chapter*; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs).

Le sorgenti di acqua possono essere contaminate dai rifiuti industriali, dalle acque reflue, dall'infiltrazione nei rifornimenti idrici di rifiuti tossici sepolti e dal dilavamento durante le operazioni di irrorazione del pesticida. Il trattamento dei rifiuti con alcali (o acidi come nel caso del Diazinone), seguita da neutralizzazione, può distruggere gli agenti tossici.

Da un'analisi effettuata dall'EPA sulle acque di superficie di 1530 fiumi situati vicino a centri agricoli e 604 fiumi vicini a centri urbani è risultato che il 15% dei fiumi vicini ai centri agricoli e 26% di quelli vicini ai centri urbani avevano una concentrazione di CPF che variava tra 0,026 ppb e 0,400 ppb.

Non ci sono studi che segnalino la degradazione dei pesticidi organofosforati in acqua corrente, mentre in acqua statica, in ambiente acquatico simulato, ci sono prove che la luce, le particelle sospese, e i batteri contribuiscono alla degradazione. Il Fenitrotion si degrada in acqua di lago con una emivita di circa 2 giorni in presenza di luce e di 50 giorni al buio (Greenhalgh et al. 1980). Inoltre, Drevenkar et al. 1976, e Gallo & Lawryk 1991, in uno studio effettuato su diversi campioni di acqua di fiume, ritengono che, sebbene la temperatura e il pH siano stati i principali fattori di controllo del tasso di idrolisi del Dichlorvos, le notevoli differenze di emivita del pesticida dipendono probabilmente da fattori microbiologici. La degradazione avviene per idrolisi ed ossidazione di composti mono- e di- sostituiti di acido fosforico o fosfonico o dei loro tio-analoghi. Non ci sono prove che questi prodotti siano tossici (WHO 1986).

In uno studio effettuato da Kamrin et al. nel 1997 è stato dimostrato che molto probabilmente il CPF presente nell'acqua stagnante si disperde per volatilizzazione in 3-20 giorni. Durante il periodo estivo, il CPF presente nell'acqua viene degradato per fotolisi in 3-4 settimane. Inoltre il tasso di idrolisi del CPF in acqua

6. Clorpirifos e clorpirifos-metile

aumenta con la temperatura e l'alcalinità; infatti con pH 7 e una temperatura di 25°C l'emivita dell'insetticida è di 35-78 giorni.

Negli USA il CPF è stato rilevato in meno dell'1% dei circa 3000 pozzi analizzati, con una concentrazione che variava da 0,01 a 0,65 ppb (Smegal 2000).

In alcuni stati americani i residui di CPF sono stati trovati nelle acque freatiche e di superficie. Inoltre il CPF è stato riscontrato nelle falde freatiche di Argentina, Canada, Francia, Italia e Filippine, nelle acque di superficie del Sud Australia, della Spagna e del Messico, nonché nei sedimenti delle acque basse dell'oceano del Costa Rica e di Panama.

L'EPA raccomanda, comunque, che i bambini non bevano acqua con livelli di CPF superiori a 0,03 milligrammi per litro di acqua (0,03 mg/L) per periodi superiori a 1-10 giorni.

Aria

Il CPF si disperde nell'aria per volatilizzazione (la volatilizzazione di CPF dalle foglie rappresenta quasi l'80% della quantità utilizzata), reagisce con i radicali idrossili prodotti nell'atmosfera ed è degradato a CPF-oxon, con un'emivita di 4,2 ore (USDA, June 2005). Il CPF e gli altri insetticidi organofosforici possono essere trasportati fino a 25 miglia dal luogo di applicazione provocando anche a distanza la contaminazione da CPF dell'acqua piovana e della nebbia.

In uno studio effettuato da Harnly M. et al. nel 2005 sono state testate le concentrazioni di CPF presenti nell'aria dopo l'applicazione al suolo dell'insetticida in ambiente agricolo per un periodo di quattro settimane in primavera, 24 ore al giorno, cinque giorni alla settimana in stazioni di controllo situate entro tre miglia dalle applicazioni. La concentrazione media di CPF riscontrata nell'aria è stata valutata circa 33 ng/m³.

3. Effetti sugli animali

Il CPF e il m-CPF sono abbastanza tossici per gli uccelli, pericolosi per la fauna selvatica e le api da miele; sono invece fortemente tossici per i pesci d'acqua dolce, gli invertebrati acquatici e marini e possono provocare effetti negativi a lungo termine per l'ambiente acquatico e per la loro persistenza nei sedimenti, rappresentano un pericolo anche per i fondali marini.

Ali et al. (2008) hanno studiato i danni al DNA indotti dal CPF nel pesce d'acqua dolce *Channa teleosteo punctatus* utilizzando il test dei micronuclei (MN test) e il Comet assay. I pesci sono stati sottoposti a diverse concentrazioni di CPF (203, 406 e 609 mg/l) per 96 ore e i campionamenti sono stati effettuati ad intervalli regolari. Effetti significativi ($P < 0,01$) sono stati osservati a

INTERFERENTI ENDOCRINI ■ SCHEDE MONOGRAFICHE

tutte le concentrazioni. L'induzione dei micronuclei per tutte le concentrazioni è stata più elevata nel sangue periferico. Una tendenza simile è stata osservata per i danni al DNA misurati in termini di percentuale di DNA nei linfociti della coda e nelle cellule branchiali.

Ci sono pochi studi sulla valutazione del rischio per la fauna selvatica a causa della mancanza di metodi quantitativi disponibili per valutare i rischi dovuti ad esposizioni cutanee e da inalazione per gli animali selvatici (USDA 1999). Il CPF è tossico per le api da miele con una LD50 orale di 360 ng/ape e una LD50 per contatto di 70 ng/ape (Tomlin 2006). In Italia nel 2007, durante la fioritura del melo, sono state segnalate da parte degli apicoltori morie di intere popolazioni di api, da imputare probabilmente all'impiego del CPF. In uno studio effettuato nel 2008 è stato evidenziato che nel 2007 il trattamento con CPF era stato eseguito in fase di fioritura. In seguito a questo studio è stato stabilito che i trattamenti con CPF devono essere eseguiti in fase di pre-fioritura. Anche trattamenti effettuati su grano saraceno in fioritura hanno causato la morte di numerose api. Non sono stati riscontrati invece danni prolungati dovuti al deterioramento della covata o ad una moria permanente.

Alcuni studi hanno dimostrato che i residui del CPF sulle foglie sono tossici anche per gli insetti non target fino a 24 ore dopo il trattamento (USEPA 1999).

Il CPF è altamente tossico per i piccioni e per i passerai (LD50 di 10 mg/kg), è molto tossico per i gracchi comuni (LD50 5,62 mg/kg) ed i fagiani (LD50 8,41 mg/kg), è tossico per i polli (LD50 orale che varia da 32-102 mg/kg) e moderatamente tossico per le anatre (un LD50 di 490 mg/kg) (Tomlin 2006). Il pettirosso americano è la specie aviaria più frequentemente vittima del CPF anche se la LD50 è ancora sconosciuta (USEPA 1999).

In studi di farmacocinetica effettuati su grasso di gallina è stato evidenziato che tra i pochi pesticidi organofosforici lipofili che possono rimanere nel corpo per molti giorni o settimane, il leptophos radiomarcato tende a persistere con un'emivita di circa 17 giorni (Abou-Donia & Graham 1978).

I primi segni della tossicità acuta possono comparire pochi minuti dopo l'esposizione al CPF. I sintomi compaiono tipicamente sui recettori muscarinici, in seguito su quelli nicotinici ed infine sul sistema nervoso centrale.

Nelle sperimentazioni effettuate sui gatti è stata evidenziata una dose mortale compresa tra 10-40 mg/kg. L'esposizione può provocare una sindrome intermedia, i cui segni compaiono dopo più di 24 ore dall'esposizione, e che può durare parecchi giorni o persino settimane. Nei cani e nei gatti i segni sembrano svilupparsi in 24-72 ore. Sembra che la sindrome intermedia determini la tolleranza alla sovrastimolazione di AChE nei recettori muscarinici. Questa tolleranza non si sviluppa

nei ricevitori nicotinici e quindi la sindrome è caratterizzata soprattutto dagli effetti nicotinici. Quando il CPF era impiegato per uso domestico, l'esposizione cutanea dei gatti ai residui dell'insetticida era causa, 3-10 giorni dopo l'esposizione, di sindrome intermedia negli animali domestici.

Un altro fenomeno indotto dagli OP è la neuropatia ritardata (OPIDN) che differisce dalla sindrome intermedia poiché i sintomi si manifestano settimane dopo un'esposizione acuta. I gatti ed i polli esposti a dosi sovraletali di CPF mostravano i segni connessi a neuropatia ritardata. In entrambi i casi, gli animali sono stati trattati con atropina per risolvere i sintomi colinergici acuti (atassia, movimenti alterati e alterazione della percezione spaziale).

L'endpoint più sensibile nei ratti, nei topi e nei cani esposti cronicamente al CPF è l'inibizione del ChE nel plasma, nei globuli rossi e nel cervello. I cani hanno mostrato un aumento delle dimensioni del fegato alle dosi di 3 mg/kg/giorno. I ratti esposti a 7-10 mg/kg/giorno hanno manifestato fluttuazioni del peso corporeo, effetti avversi agli occhi e alterazioni nel metabolismo del fegato. I topi sembrano essere meno sensibili alle esposizioni orali croniche, con diminuzione del peso corporeo ed aumento anormale del tessuto alle dosi di 45-48 mg/kg/giorno.

In ratti Fischer 344 di entrambi i sessi l'esposizione orale a 1 mg/kg/giorno di CPF per 2 anni aveva ridotto significativamente il livello di colinesterasi nel plasma e nel sangue. Bassi livelli di esposizione cronica agli OP possono condurre allo sviluppo di una tolleranza agli effetti di inibizione di ChE negli animali esposti. Benché il meccanismo esatto dello sviluppo di tolleranza non sia stato identificato, è possibile che i cambiamenti nei recettori postsinaptici possano attenuare alcuni degli effetti dell'acetilcolinesterasi.

Quando si sviluppa una tolleranza ai composti dell'acetilcolinesterasi gli animali sembrano più resistenti agli effetti dell'inibizione di ChE ed i sintomi della tossicità possono diminuire o sparire completamente.

Moser et al. nel 1998 studiarono le differenze quantitative e qualitative eventuali nella sensibilità al CPF in termini di cambiamenti del comportamento e inibizione della colinesterasi in topi Long-Evans di tre età differenti: giovani (17 giorni dalla nascita; indicati come PND 17), adolescenti (27 giorni dalla nascita; indicati come PND27) e adulti (70 giorni). Ai ratti, sia maschi che femmine, fu somministrata una di due dosi di CPF prestabilite per ciascuna età: 5 o 20 mg/kg per i PND17; 20 o 50 mg/kg per i PND27 e 20 o 80 mg/kg per gli adulti e furono testati gli effetti ad almeno 3,5 o 6,5 ore dalla somministrazione. Il test sul comportamento includeva valutazioni di osservazione e di misurazioni dell'attività motoria ed era seguito immediatamente dal prelievo tissutale per la determinazione del-

l'attività colinesterasica nel cervello e nel sangue. Sia per quanto riguarda i cambiamenti nel comportamento e l'inibizione della colinesterasi, gli effetti massimi si ottennero a 3,5 ore nei maschi adulti e nei PND17 di entrambi i sessi, mentre si ottennero a 6,5 ore nelle femmine adulte e nei PND17 di entrambi i sessi. In seguito alla somministrazione della dose di 20 mg/kg si evidenziò una minore inibizione della colinesterasi e minori effetti sul comportamento con l'aumento dell'età dei ratti. La dose maggiore utilizzata per ogni gruppo d'età produceva simili livelli di inibizione della colinesterasi cerebrale (80-90%) e simili effetti comportamentali. Il grado di inibizione colinesterasica nel cervello risultava molto più vicino a quella sierica nei topi giovani se confrontata con quella di adulti. Si è a conoscenza del fatto che la carbossilesterasi e l'A-esterasi giocano un ruolo importante nella detossificazione dei pesticidi OP e potrebbero essere parzialmente responsabili per le differenze di sensibilità osservate. Le attività epatiche e sieriche di questi enzimi furono misurate in ratti maschi non trattati con CPF dopo 1, 4, 7, 12, 17, 21 giorni e negli adulti di entrambi i sessi. I ratti prima dello svezzamento sembravano avere minori livelli di attività di entrambi gli enzimi e le femmine adulte risultavano avere meno attività della carbossilesterasi rispetto ai maschi. Queste differenze negli enzimi di detossificazione risultano quindi probabilmente connesse con le differenze età-correlate negli effetti comportamentali e a livello biochimico conseguenti l'esposizione al CPF così come con le differenze sesso-correlate osservate nei ratti adulti; potrebbero quindi in conclusione avere una importante influenza anche sulla differente sensibilità all'esposizione al composto stesso.

Recenti studi svolti sugli animali rivelano che il CPF possa avere un effetto neurotossico non attribuibile alla sua azione inibitoria sull'acetilcolinesterasi. Caughlan et al. in uno studio pubblicato nel 2003 riportano che il CPF, il CPF-oxon ma non il TCP inducono apoptosi in colture primarie di neuroni corticali di ratti appena nati e di 17 giorni di gestazione. È generalmente noto che il CPF-oxon sia tre volte più potente del CPF nell'inibire l'attività dell'acetilcolinesterasi cerebrale ma secondo i dati ottenuti da questi autori il CPF-oxon sembra essere solo poco più potente del CPF nell'inibire l'apoptosi nei neuroni corticali; ciò sta ad indicare che l'induzione dell'apoptosi ad opera di questo composto potrebbe avvenire indipendentemente dall'inibizione dell'AChe. Inoltre il CPF attiva l'ERK $1/2$ e p38 MAP chinasi e sorprendentemente si è osservato che bloccando l'attivazione di ERK $1/2$ mediante l'inibitore MEK SL327 si ottiene una piccola ma statisticamente significativa inibizione dell'apoptosi; mentre bloccando la p38 con SB202190 si ottiene un'accelerazione significativa del processo di apoptosi indotto dal CPF. Questo suggerisce che ERK

$1/2$ e p38 hanno un ruolo pro e anti-apoptotico rispettivamente. In conclusione, i dati ottenuti dallo studio evidenziano l'apoptosi come un nuovo possibile endpoint della neurotossicità del CPF che potrebbe essere indipendente dall'inibizione dell'AChE.

Altri lavori riguardanti la neurotossicità del composto indicano che l'esposizione a CPF allo stadio di sviluppo del tubo neurale induce apoptosi ed alterazioni mitotiche che però subiscono un rapido recupero prima della nascita. Qiao et al. nel 2003 valutano la possibilità che difetti nell'attività delle sinapsi colinergiche conseguenti ad esposizione prenatale a CPF si sviluppino tardivamente nello sviluppo. Nello studio CPF fu somministrato a ratti femmine gravide tra il nono e dodicesimo giorno di gestazione e fu in seguito esaminato lo sviluppo del sistema acetilcolinico e comparati gli effetti ai normali biomarkers di sviluppo neurologico. La colina-acetiltransferasi, un marker costitutivo per i terminali nervosi colinergici, risultava aumentata nell'ippocampo e nello striato in adolescenza e in età adulta; al contrario l'HC-3 legato al trasportatore di colina presinaptico, un indice dell'attività di impulso nervoso, era marcatamente sotto la norma. I risultati ottenuti indicano che lo sviluppo cerebrale, in particolare quello dell'ippocampo, risente dell'esposizione al CPF indipendentemente dal fatto che essa si verifichi precocemente o tardivamente nello sviluppo e il difetto risultante emerge nell'adolescenza o in età adulta anche in situazioni in cui i valori normali dei biomarker sono inizialmente ripristinati nel periodo post-esposizione.

4. Rischi espositivi per la popolazione

La popolazione generale risulta esposta al CPF principalmente attraverso l'inalazione di aria e l'ingestione di cibi contaminati; ulteriore rischio espositivo si ha attraverso l'assorbimento percutaneo del composto durante o successivamente la sua applicazione.

La fondamentale causa di contaminazione è rappresentata dall'esposizione professionale che riguarda numerose categorie di lavoratori sia quelli coinvolti nella sintesi di questi pesticidi, nella loro formulazione e distribuzione, nel loro utilizzo in agricoltura, sia gli operatori sanitari addetti ai controlli dei patogeni o che si occupano di eseguire le procedure sui pazienti contaminati.

Uno studio condotto tra il 1981 e il 1983 dal NIOSH riguardante il numero di lavoratori e di impianti dove i lavoratori potessero essere potenzialmente esposti al CPF negli USA, stimò che 911 portieri e addetti alle pulizie negli impianti di imballaggio di carne, pane, dolci ed industrie di prodotti connessi, 10.452 addetti al controllo dei parassiti e 41 giardinieri nell'industria medica furono esposti al composto (NIOSH 1994).

Uno studio del 1987 svolto in California su lavoratori responsabili del controllo delle pulci in animali domestici indicava che l'utilizzo del CPF era associato ad episodi frequenti di riduzione del visus, eruzioni cutanee ed oliguria in questi soggetti, mostrando una correlazione tra esposizione professionale e sintomatologia presentata (Ames et al. 1989).

Hodgson et al. nel 1986 riportavano sintomi di intossicazione da OP in 5 impiegati in seguito all'esposizione a CPF utilizzato per il controllo delle termiti.

Una categoria di lavoratori particolarmente a rischio di esposizione al CPF e agli OP è quella degli operatori addetti al controllo delle termiti sui quali esistono diversi dati raccolti in differenti studi.

Gotoh et al. in uno studio condotto in Giappone nel 2000 su 64 addetti al controllo delle termiti esposti al CPF ed annualmente visitati presso l'Asahi Rosai Hospital, rilevarono nei soggetti analizzati una severa depressione dell'attività della butirrilcolinesterasi sierica e dell'acetilcolinesterasi eritrocitaria, una riduzione della velocità di conduzione nervosa dei nervi sensitivi e notevoli alterazioni all'elettroretinografia correlate ad una ripetuta esposizione al CPF.

Nonostante le alterazioni rilevate a livello laboratoristico, i soggetti non presentavano sintomi soggettivi evidenti di avvelenamento da OP ma periodici controlli medici sono ritenuti necessari al fine di proteggere la salute di questi lavoratori.

Steenland et al. studiarono da un punto di vista neurologico 191 addetti al controllo delle termiti che lavorano utilizzando il CPF in 12 aree del Nord Carolina tra il 1987 e il 1997 confrontando i risultati ottenuti con quelli di un gruppo di controllo formato da 189 non esposti.

La media dei livelli di 3,5,6-tricloro-2-piridinolo (TCP) urinario per 65 lavoratori recentemente esposti risultava di 629,5 $\mu\text{g/l}$ rispetto ai 4,5 $\mu\text{g/l}$ della popolazione generale statunitense.

Il gruppo degli esposti non differiva significativamente da quello dei non esposti nei test di valutazione clinica; poche ma significative differenze furono rilevate invece nei dati della velocità di conduzione nervosa, tremore alle mani e braccia, sensibilità tattile e vibratoria, visione, olfatto, nei test visuo-percettivi e neuro-comportamentali. I soggetti esposti presentavano anche altri sintomi significativi come problemi di memoria, alterazione dell'umore, astenia ed ipostenia correlabili con l'esposizione al composto.

Per quanto riguarda invece i lavoratori coinvolti nei processi di sintesi del CPF, Albers et al. nel 2004 analizzarono un gruppo di 66 addetti alla sintesi di CPF della Dow Chemical Company in Michigan e li confrontarono con un gruppo altrettanto numeroso di soggetti non esposti. Essi rilevarono un aumento dell'escrezione urinaria del TCP nei soggetti esposti professionalmente e una riduzione dell'attività della butirril-

colinesterasi sierica correlati all'esposizione cronica professionale al CPF senza però evidenze cliniche o subcliniche di una neuropatia periferica negli stessi soggetti rispetto a controlli.

Considerando poi la categoria dei lavoratori responsabili della distribuzione dei pesticidi ad uso agricolo, Hoffman et al. in uno studio pubblicato nel 2009 e condotto tra il 2006 e 2007 su 154 lavoratori operanti nello stato di Washington responsabili della distribuzione a livello agricolo di CPF ed altri pesticidi OP, rilevarono una significativa riduzione media dell'attività della butirril-colinesterasi sierica del 5,6% tra i partecipanti allo studio nella stagione di distribuzione della miscela di pesticidi. Differenti e specifiche pratiche e condizioni lavorative risultavano associate a una maggiore inibizione della butirril-colinesterasi, comprese le pratiche di preparazione e miscelazione dei pesticidi nonché di pulitura del materiale per l'attività di distribuzione di composti.

Fattori di protezione nei confronti dell'esposizione ai pesticidi comprendevano l'uso di respiratori full-face, di scarponi resistenti alle sostanze chimiche e stoccaggio di dispositivi di protezione individuale in un armadietto al lavoro.

Nonostante le normative già esistenti, il personale addetto alla distribuzione dei pesticidi OP in agricoltura continua ad essere esposto ai rischi conseguenti al loro utilizzo risultanti in una inibizione dell'attività della BuCh sierica.

L'esposizione professionale può inoltre determinare la contaminazione secondaria accidentale delle famiglie dei lavoratori.

Differenti studi sostengono che i bambini che abitano in zone agricole possono essere esposti nello stesso modo degli altri bambini, ovvero attraverso il consumo di cibo contaminato, l'uso casalingo di pesticidi; possono essere poi contaminati attraverso l'uso di pesticidi nei terreni agricoli vicini, assumendo latte contaminato dalle loro madri, giocando nei campi e mediante il trasporto di pesticidi in casa da parte di genitori o membri della famiglia che lavorano nei campi.

Per esempio, dati ottenuti da studi condotti per l'Agricultural Health Study in North Carolina e Iowa indicano l'esistenza di alti livelli di pesticidi recentemente applicati nel cibo, nelle case e nei liquidi biologici delle famiglie che lavorano nel settore agricolo e nei bambini appartenenti ad esse.

In uno studio eseguito su 88 bambini nella Yakima Valley, Washington, Loewenherz et al. riportavano una maggiore frequenza di rilevazione di metaboliti organo fosforici nei figli di applicatori di pesticidi rispetto ai non applicatori.

Simcox et al. studiarono 59 famiglie nella Yakima Valley e confrontarono i livelli di quattro pesticidi organo fosforici nelle case di alcuni agricoltori, famiglie residenti in zone agricole e famiglie non residenti in tali

zone. Il CPF fu rilevato nel 95% delle case, le concentrazioni del composto risultarono essere più alte nelle famiglie rurali rispetto alle altre e gli applicatori di pesticidi avevano concentrazioni più alte in casa rispetto agli altri soggetti presi in considerazione nello studio.

Bradman e colleghi condussero uno studio sull'esposizione ai pesticidi di bambini di agricoltori e non appartenenti ad una grande comunità nella Central Valley in California.

Furono prelevati campioni di residui dal pavimento e dalle mani dei bambini appartenenti a 10 famiglie, 5 delle quali avevano almeno un componente impiegato in lavori agricoli. Alti livelli di diazinon (valore massimo = 160 ppm), CPF (valore massimo = 33 ppm) e malathion (valore massimo = 1,6 ppm) furono trovati nei residui prelevati nelle case degli agricoltori. Residui di diazinon e CPF furono trovati sulle mani di 2 e 3 bambini di agricoltori, rispettivamente, che vivevano anche nelle case con più residui rilevati sui pavimenti.

Fenske et al. nel 2005 hanno esaminato i risultati di cinque studi di biomonitoraggio dei pesticidi organofosforici condotti nello Stato di Washington tra il 1994 e il 1999 nei quali sono stati confrontati i livelli di dimetil-tiofosfato urinario (DMTP) e le concentrazioni di composti dimetilalchilfosfati (DMAP) in due gruppi di bambini, uno costituito da quelli che vivono nell'area metropolitana di Seattle e l'altro dai figli dei lavoratori agricoli dello Stato di Washington. È stato riscontrato che i livelli di metabolita nei bambini che vivono nelle comunità agricole sono elevati durante i periodi di irrorazione dei raccolti con i pesticidi. Si può affermare che i lavoratori che hanno contatto diretto con gli antiparassitari devono continuare ad essere al centro dell'attenzione pubblica per gli interventi sanitari, poiché durante i periodi di irrorazione attiva delle colture con i pesticidi possono verificarsi elevate esposizioni dei bambini che vivono nelle comunità agricole.

In alcuni paesi si deve poi considerare anche il rischio legato all'utilizzo di queste sostanze nei tentativi di suicidio o per scopi terroristici e bellici (gas nervini) che costituiscono avvelenamenti intenzionalmente più gravi e più frequenti di quelli accidentali o professionali. Il Sarin, ad esempio, è stato utilizzato durante l'attacco alla metropolitana di Tokyo, e sia il Tabun che il Sarin sono stati utilizzati durante il conflitto Iraq-Iran.

5. Organi *target* ed effetti sul metabolismo dell'uomo

Il CPF e il m-CPF, come gli altri pesticidi organofosforici, possono essere assorbiti per ingestione e inalazione. L'assorbimento può avvenire anche per via cutanea ed i loro effetti tossicologici sono quasi interamente dovuti all'inibizione dell'acetilcolinesterasi.

6. Clorpirifos e clorpirifos-metile

INTERFERENTI ENDOCRINI ■ SCHEDE MONOGRAFICHE

Il CPF viene trasformato dall'organismo in CPF-oxon che è circa 3000 più volte potente contro il sistema nervoso del CPF stesso.

Il m-CPF è un debole inibitore dell'acetilcolinesterasi. È metabolizzato ed escreto rapidamente dal corpo.

I principali organi bersaglio di CPF e m-CPF sono il sistema nervoso, respiratorio e cardiovascolare. I prodotti di degradazione nell'ambiente non sono tossici in misura significativa, mentre i prodotti di decomposizione termica possono essere nocivi per via inalatoria e cutanea. La tossicità può anche essere dovuta agli effetti dei componenti presenti nei formulati dei pesticidi.

Come per gli altri pesticidi organofosforici, i sintomi iniziali di avvelenamento possono includere sudorazione eccessiva, mal di testa, debolezza, vertigini, nausea, vomito, dolori di stomaco, visione offuscata, cattiva articolazione della parola e contrazioni di muscoli. In caso di ingestione di una dose eccessiva di più sintomi avanzati di avvelenamento possono essere convulsioni, coma, perdita di riflessi e perdita di controllo dello sfintere.

L'esposizione respiratoria è maggiormente dannosa con le polveri rispetto al prodotto diluito, anche se un aerosol di pesticida concentrato può risultare comunque più tossico (WHO 1986).

Molti avvelenamenti accidentali acuti si verificano per contatto del pesticida con la pelle e gli indumenti. Il grado di assunzione dipende dal tempo di persistenza (volatilità, abbigliamento, copertura e completezza del lavaggio dopo l'esposizione), e anche dalla presenza di solventi e emulsionanti che possono facilitare l'assorbimento. Le formulazioni in polvere hanno anche un potenziale di assorbimento cutaneo (Wolfe et al. 1978). L'assorbimento cutaneo è favorito dalle alte temperature e può essere potenziato in presenza di dermatite che è in grado di determinare un avvelenamento grave anche in seguito ad un'esposizione che di solito non causa effetti (Gallo & Lawryk 1991).

L'esposizione a vapori, polveri o aerosol può causare effetti locali sulla muscolatura liscia degli occhi. A questo può seguire un avvelenamento sistemico. L'esposizione parenterale può essere invece accidentale o intenzionale.

Quando i pesticidi organofosforici entrano nel corpo, sono immediatamente soggetti nei tessuti ad una serie di reazioni e biotrasformazioni. Data l'intrinseca instabilità, la loro permanenza nei tessuti umani non dovrebbe essere prolungata. Studi sperimentali sugli animali indicano un'escrezione rapida di questi composti. Tuttavia, alcuni antiparassitari organofosforici sono molto lipofili e possono essere assorbiti nel tessuto adiposo e poi rilasciati anche dopo molti giorni. I dietil-lipofil-fosforici (azinophos etile, bromofos etile, CPF, coumaphos, diazinone, parathion, Fosalone Sulfotep) possono rimanere nel corpo per molti giorni o settimane, nei casi più

gravi, e possono determinare il ripetersi degli effetti clinici dopo un periodo iniziale di apparente recupero. Un avvelenamento da fenitroion prontamente trattato con terapia convenzionale può provocare una recidiva dei sintomi attribuiti alla mobilitazione degli organofosfati immagazzinati nel tessuto adiposo. Per contro, il diclorvos (un fosfato di dimetile) e l'omotoato (un dimetil osfotioato) sono idrolizzati rapidamente dal plasma e dalle esterasi dei tessuti a prodotti inattivi e non rischiano di provocare effetti clinici ritardati (Ecobichon et al. 1977; Minton & Murray 1988).

È possibile determinare il tasso di smaltimento dei metaboliti, e quindi la stima approssimativa di dimezzamento del pesticida nel corpo. L'emivita biologica della maggior parte dei pesticidi organofosforici e dei loro metaboliti inibitori in vivo è relativamente breve (WHO 1986). Ad esempio, l'emivita plasmatica del malathion in un maschio bianco che, in un tentativo di suicidio, si era iniettato per via endovenosa circa 3 ml di una soluzione al 50% di malathion nell'avambraccio destro, è stata di 2,89 ore (Lyon et al. 1987). I pesticidi organofosforici sono metabolizzati principalmente per ossidazione e idrolisi dalle esterasi e per reazione con il glutatione, ma possono essere sottoposti anche a demetilazione e glucuronidazione. L'ossidazione può portare alla produzione di composti più o meno tossici. In generale, i fosforotiolati non sono direttamente tossici, ma devono essere ossidati alla tossina prossimale. La reazione con la glutatione-transferasi produce composti che sono, nella maggior parte dei casi, a bassa tossicità. Reazioni idrolitiche e transferasiche incidono sia sui tioli sia sulle loro oxons. Nei primi processi metabolici avvengono numerose reazioni di coniugazione e l'eliminazione del contenuto fosforico residuo può avvenire attraverso le urine o le feci. Il Paration, ad esempio, può essere attivato in paraoxon, un potente inibitore della colinesterasi, da una conversione ossidativa che avviene nel fegato attraverso gli enzimi del citocromo P450 microsomiale. Entrambi i composti sono rapidamente idrolizzati dalle esterasi plasmatiche e tissutali ad acido dietil-tiofosforico, acido dietil-fosforico, e para-nitrofenolo. Questi prodotti vengono escreti principalmente attraverso le urine e rappresentano gran parte della dose di paration assorbita (Baselt 1982). I fosforotiolati che contengono un legame $P = S$, prima di acquisire una sostanziale attività anticolinesterasica, devono essere convertiti nell'analogo fenossido. Non ci sono prove della permanenza prolungata degli antiparassitari organofosforici nei tessuti, ma il processo di eliminazione dipende dalla velocità delle reazioni coinvolte. La maggior parte sono degradati rapidamente dalle reazioni metaboliche descritte. L'eliminazione dei prodotti, soprattutto attraverso le urine e in quantità minori attraverso le feci e l'aria espirata, è tale che i tassi di escrezione di solito raggiungono un picco di declino abba-

stanza rapidamente entro due giorni (WHO 1986). Studi sperimentali effettuati su animali hanno mostrato che la maggior parte di una dose marcata di pesticidi organofosforici viene rapidamente escreta attraverso l'aria espirata, le urine e le feci. Circa il 67-100% di somministrato radioattivo è stato recuperato entro una settimana da urine e feci di mucche, topi e una capra trattati con varie dosi di 32P-dichlorvos (Blair et al. 1975).

I pesticidi organofosforici esercitano i loro effetti acuti inibendo l'acetilcolinesterasi nel sistema nervoso con conseguente accumulo di livelli tossici di acetilcolina. Esse possono anche inibire le butilcolinesterasi ed altre esterasi. La funzione della butilcolinesterasi è sconosciuta, ma la sua inibizione può fornire un'indicazione di esposizione ad un organofosforico. In molti casi, questo enzima organofosforilato è abbastanza stabile, quindi il recupero dall'intossicazione potrebbe essere lento.

La riattivazione dell'enzima inibito può avvenire spontaneamente con un tasso di riattivazione che dipende dal tessuto e dal gruppo chimico coinvolto.

Una polineuropatia ritardata può essere innescata dall'attacco di un'esterasi del tessuto nervoso distinto dall'acetilcolinesterasi. Il target è l'attività dell'esterasi detta neuropatia target-esterasi (NTE) (esterasi neurotossica). Il disordine si sviluppa non a causa della perdita dell'attività dell'esterasi, ma a causa di un cambiamento determinato nella proteina che risulta dal processo di invecchiamento inibito dalla NTE: l'attività catalitica della NTE appare nel tessuto nervoso, anche durante il periodo di sviluppo della neuropatia (WHO 1986).

La reazione chimica che avviene negli esseri umani è la trasformazione del doppio legame dell'a-

tomo di fosforo centrale che perde lo zolfo e si lega all'ossigeno. Questa reazione metabolica avviene nel fegato e si traduce nell'attivazione metabolica di CPF in oxon-CPF, inibitore più potente delle colinesterasi (Figura 1).

Un'altra importante reazione metabolica che si verifica nel corpo umano è la reazione di detossificazione metabolica di CPF e oxon-CPF (Figura 2).

Il CPF è ben assorbito attraverso la mucosa gastrointestinale e l'apparato respiratorio, ma l'assorbimento cutaneo è molto meno efficace.

La pelle rappresenta un'efficace barriera alla penetrazione, a meno che il pesticida non venga miscelato con un carrier o la pelle stessa sia compromessa.

Comunque, dal momento che tutti i prodotti commerciali contenenti CPF, con eccezione delle forme granulari, contengono solventi od emulsionanti, l'esposizione umana al CPF non mescolato ad un carrier è rara.

Nolan et al. nel 1984 valutarono l'assorbimento orale e cutaneo del CPF in 6 maschi adulti: in media il 70% della dose orale veniva assorbita contro solo il 3% della dose cutanea.

Una volta assorbito il CPF è rapidamente distribuito a tutti gli organi e apparati (Shah et al. 1981; Smith et al. 1967). L'emivita di eliminazione del composto è stata stimata nell'uomo pari a 27 ore (Nolan et al. 1984).

La sede principale del metabolismo del CPF è il fegato dove esso viene rapidamente bioattivato, mediante desolforazione, da una monossigenasi P-450 dipendente, a CPF-oxon; la detossificazione di quest'ultimo è altrettanto rapida (Ma and Chambers 1994; Sultatos and Murphy 1983a).

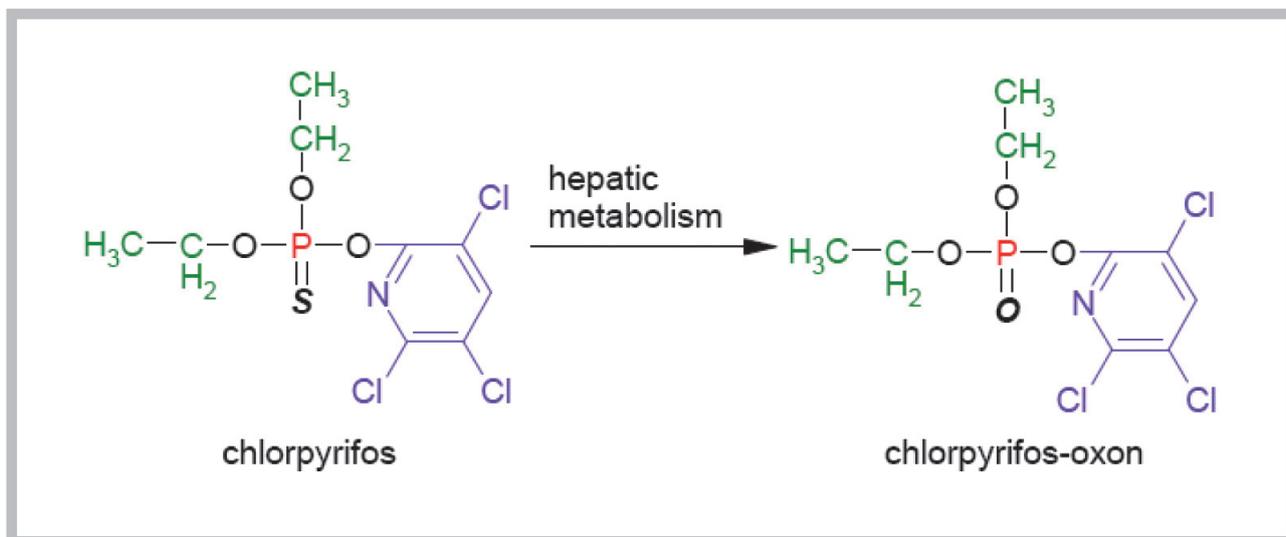


Figura 1. Reazione di attivazione metabolica del CPF con trasformazione nel suo metabolita tossico oxon-CPF. L'attivazione coinvolge la conversione dei tioli ad oxon (NPIC Biomarkers of Exposure: Organophosphates Oregon State University, 333 Weniger Hall, Corvallis, Oregon 97331-6502 Phone: 1-800-858-7378 Fax: 1-541-737-0761 Email: npic@ace.orst.edu NPIC at <http://npic.orst.edu/>).

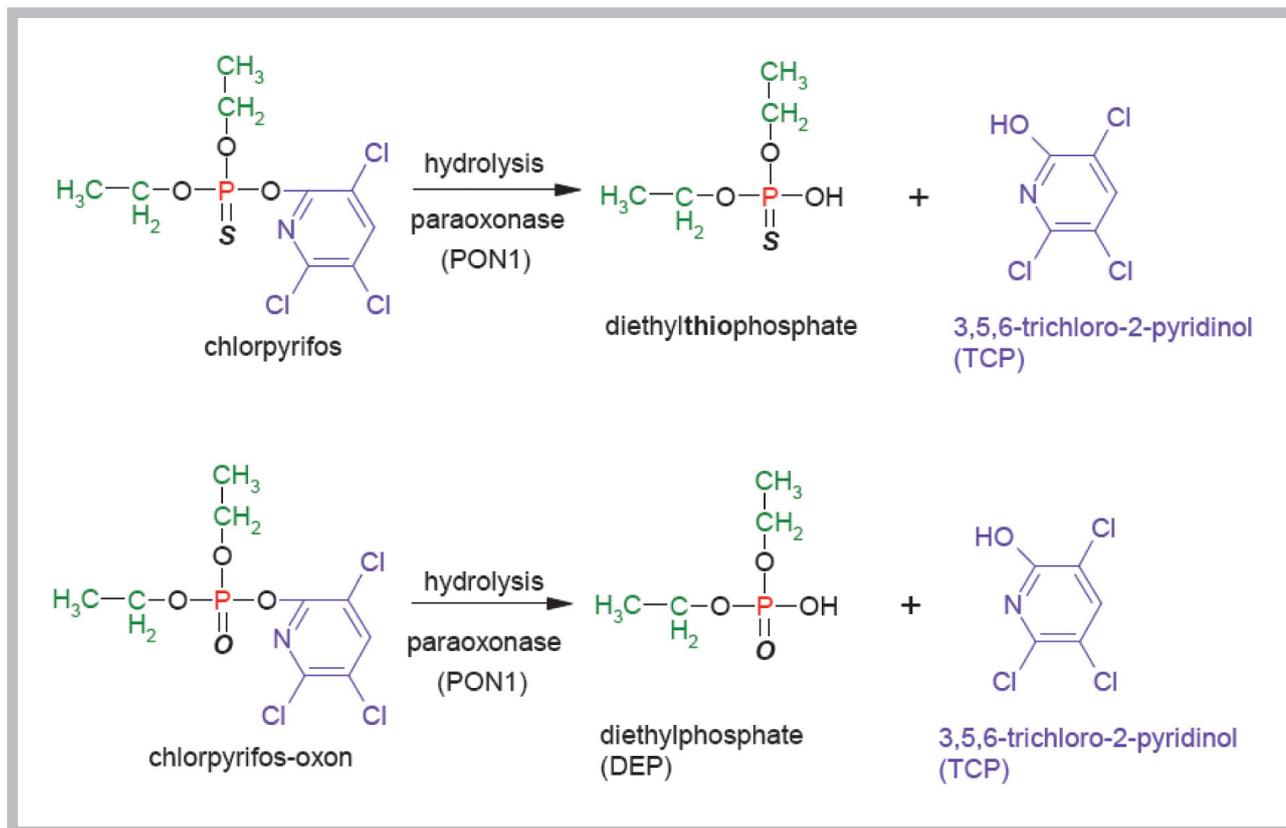


Figura 2. Reazioni di detossificazione metabolica di CPF e oxon-CPF per idrolisi. (NPIC Biomarkers of Exposure: Organophosphates Oregon State University, 333 Weniger Hall, Corvallis, Oregon 97331-6502 Phone: 1-800-858-7378 Fax: 1-541-737-0761 Email: npic@ace.orst.edu NPIC at <http://npic.orst.edu/>).

È raro trovare sia il CPF che il CPF-oxon nei campioni di fluidi corporei (Nolan et al. 1984), eccetto che nei casi di esposizione a dosi molto elevate. Ciò che viene rilevato in circolo è il maggiore metabolita del CPF-oxon, ovvero il TCP (Bakke et al. 1976; Nolan et al. 1984; Smith et al. 1967); esso viene quasi esclusivamente (90%) escreto con le urine (Bakke et al. 1976; Smith et al. 1967).

Studi di tossicocinetica svolti sui ratti hanno rilevato che in seguito ad esposizione ad una singola dose di CPF, la maggior parte del composto viene eliminato entro 48 ore, perciò i livelli di TCP nelle urine possono essere utilizzati come biomarcatori qualitativi dell'esposizione al CPF purché le misurazioni vengano eseguite entro 48 ore dall'esposizione.

La dose di CPF è importante nel predire la potenziale tossicità e fattori come età, condizioni di salute e il sesso possono significativamente abbassare la soglia della dose necessaria per ottenere effetti tossici sull'uomo.

Tentativi su piccola scala di quantificare la tossicità legata all'esposizione al CPF in applicatori di pesticidi suggeriscono che un'esposizione di durata intermedia a

basse dosi del composto può avere effetti avversi sulla salute di questi soggetti (Ames et al. 1989); non è chiaro se gli effetti possano essere correlati ad un'azione diretta sugli organi bersaglio o semplicemente siano dovuti ad un'inibizione dell'acetilcolinesterasi.

6. Tossicità e cancerogenicità

Per gli adulti la maggior parte dei pesticidi organofosforici sono altamente tossici. Il livello di tossicità (LD umano orale) varia da un valore inferiore a 5 mg/kg ad un valore di 0,5-5 g/kg. La dose letale di parathion stimato per un adulto per ingestione o inalazione è 1-20 mg (Gosselin et al. 1984).

Una dose orale di 7,2 mg di paration, somministrata ogni giorno a volontari per sei settimane, ha ridotto l'attività della colinesterasi dell'84% negli eritrociti e del 63% nel plasma, 28 giorni dopo la fine dell'esperimento questi valori sono stati solo parzialmente ripristinati ai valori di controllo pre-esperimento (Edson 1964).

La dose letale di diazinone stimata per gli esseri umani è 25 g per ingestione orale.

Dosi orali di diazinon somministrate a volontari per 37 giorni al dosaggio di 0,02 mg/kg al giorno hanno ridotto i livelli plasmatici di colinesterasi dell'86% rispetto ai livelli di pre-esposizione. Dosaggi di 0,05 mg/kg al giorno per 28 giorni hanno ridotto i livelli a 60-65%, ma nessun dosaggio ha modificato i livelli della colinesterasi eritrocitaria. La dose media letale del malathion nell'uomo è stimata a 60 g (Baselt 1982).

Alcuni bambini sono morti dopo aver ingerito solo 2 mg di parathion pari a una dose di circa 0,1 mg/kg. Gli animali giovani sono più sensibili rispetto agli adulti della stessa specie, e lo stesso può essere vero per i bambini (Gosselin et al. 1984).

Un bambino di 34 mesi è sopravvissuto a una dose di circa 190 mg/kg di malathion, ed un bambino di soli 40 giorni di età, è sopravvissuto ad una dose di circa 1750 mg (circa 407 mg/kg). Studi sugli animali hanno rivelato lievi cambiamenti a livello renale. La tossicità renale non sembra essere una caratteristica da avvelenamento acuto da insetticidi organofosforici (Gallo & Lawryk 1991).

Il m-CPF ha effetti moderatamente tossici per l'uomo se assunto singolarmente, ma attraverso una dieta con altri organofosforici (diazinone e piretroidi), per effetto cumulativo, può manifestare la sua tossicità sul sistema nervoso, soprattutto dei bambini. Agisce sul sistema nervoso centrale, sistema cardiovascolare e respiratorio. Effetti cronici sono stati riscontrati in lavoratori ripetutamente esposti all'uso del CPF. Tra questi perdita di memoria e concentrazione, disorientamento, depressione, emicrania, insonnia o sonnambulismo. È rapidamente assorbito nel circolo sanguigno attraverso il tratto gastrointestinale, i polmoni o la pelle. È eliminato principalmente per via renale.

Poiché l'avvelenamento da pesticidi organofosforici può essere inibito da diverse classi di enzimi i suoi effetti potrebbero essere potenziati dalla copresenza di più principi attivi contemporaneamente (multiresiduo), interazioni chimiche complesse con farmaci e con altri pesticidi o prodotti chimici. Il potenziamento potrebbe coinvolgere anche i solventi o gli altri componenti del formulato del pesticida (Gallo & Lawryk 1991). Alcuni farmaci (fenotiazine, antistaminici, deprimenti del SNC, barbiturici, xantine, teofillina, aminoglicosidi e agenti parasimpaticomimetici) causano un aumento della tossicità.

Il quadro clinico da avvelenamento da pesticidi organofosforici per ingestione deriva dall'accumulo di acetilcolina nelle terminazioni nervose. In caso di inalazione i sintomi respiratori (broncocostrizione, incremento delle attività delle ghiandole secretorie, edema polmonare) ed oculari appaiono per primi. Nell'esposizione cutanea dopo l'assorbimento si verificano sudorazione localizzata e fascicolazione al sito di contatto, con effetti sistemici. Possibile esposizione secondaria dei

bambini attraverso il contatto con i loro genitori anche tramite abbigliamento contaminato.

A seconda del grado di severità dell'avvelenamento gli effetti possono essere lievi (anoressia, cefalea, vertigini, debolezza, ansia, disagio retrosternale, fascicolazioni di lingua e palpebre, miosi, e compromissione della acuità visiva), moderati (nausea, salivazione, broncorrea, lacrimazione, crampi addominali, diarrea, vomito, sudorazione, ipertensione o ipotensione, e muscolare, fascicolazioni) o gravi (miosi o midriasi, pupille non reattive, dispnea, depressione respiratoria, edema polmonare, cianosi, perdita di controllo dello sfintere, convulsioni, coma, bradicardia o tachicardia, ischemia cardiaca, aritmia cardiaca, ipopotassiemia ed iperglicemia).

Si possono anche verificare pancreatite acuta e paralisi muscolare dei muscoli respiratori.

Gli esteri organofosforici possono essere responsabili sia della sindrome colinergica (che talora si complica con la cosiddetta sindrome intermedia), sia della polineuropatia ritardata, che si manifesta solo con un numero limitato di composti.

Una crisi colinergica acuta è causata da un accumulo di acetilcolina nella sinapsi colinergica.

Le particolari caratteristiche cliniche dipendono dal tipo di recettori stimolati e dalla loro posizione:

- **Effetti muscarinici:** aumento della secrezione bronchiale, sudorazione eccessiva, salivazione e lacrimazione, broncocostrizione, crampi addominali, vomito e diarrea, bradicardia.
- **Effetti nicotinici:** fascicolazione dei muscoli, nei casi più gravi, paralisi del diaframma e dei muscoli respiratori, tachicardia e aumento della pressione sanguigna.
- **Effetti sul sistema nervoso centrale (SNC):** mal di testa, vertigini, irrequietezza e ansia, confusione mentale, convulsioni e coma, depressione vasomotoria centrale e del centro respiratorio (WHO 1986). L'insufficienza respiratoria si verifica in seguito a meccanismi mediati a livello centrale o periferico. Può manifestarsi sia durante la crisi colinergica acuta (paralisi di tipo I) sia durante una fase di apparente recupero (sindrome intermedia, paralisi o tipo II). La debolezza dei flessori del collo è un primo segnale di debolezza muscolare significativa e può essere utile per predire l'insorgenza di una crisi respiratoria.

Il contatto con gli occhi provoca un'iniziale miosi con offuscamento della vista che può essere seguita da effetti colinergici se la sostanza è stata sensibilmente assorbita.

6. Clorpirifos e clorpirifos-metile

Un bambino di 12 mesi al quale era stata somministrata una goccia di di-isopropil fluorofosfato (DFP) 0,1% in ciascun occhio ogni giorno per due mesi, ha sperimentato due brevi periodi di apnea. L'esame miotico ha rivelato pupilla non reattiva, rinorrea e lieve inibizione della colinesterasi (Verhulst & Crotty 1965; Gallo & Lawryk 1991).

Una miosi causata da contatto diretto dell'occhio può essere erroneamente interpretata come un segno di avvelenamento sistemico.

In caso di esposizione parenterale un'iniezione intradermica di paraoxon o un'applicazione superficiale di maloxon o dichlorvos sulla pelle umana ha prodotto una risposta locale di sudorazione in pochi minuti (McLaughlin & Sonneschein 1960). La somministrazione intramuscolare di DFP in individui affetti da schizofrenia, psicosi maniaco-depressiva, e contemporaneamente nei controlli normali ad una dose di 2 mg/uomo al giorno (circa 0,028 mg/kg al giorno) per sette giorni ha causato anoressia, vomito e diarrea, un po' più grave nei soggetti normali che in quelli psicotici (Rowntree et al. 1950).

In realtà è difficile che si verifichi un vero avvelenamento cronico in seguito ad esposizione a pesticidi organofosforici. Questi composti di uso comune si biotrasformano rapidamente e vengono escreti, e quindi non è possibile che avvenga un avvelenamento sub-acuto o cronico da accumulo.

Tuttavia, un'intossicazione acuta o l'esposizione cronica possono determinare effetti avversi a lungo termine o differiti. Molti pesticidi organofosforici definiscono una lenta inibizione reversibile della colinesterasi (ChE) e questo effetto può accumularsi nel tempo in modo che un individuo possa presentare una progressiva inibizione della ChE che resta però asintomatica. Segni e sintomi che si verificano quando l'inibizione della colinesterasi, prodotta da piccole e ripetute dosi, raggiunge un livello critico, sono come quelli prodotti da una singola dose elevata. L'interruzione dell'esposizione di norma si traduce in un recupero totale (Ecobichon 1996).

L'inibizione della colinesterasi persiste a volte per 2-6 settimane. Così, una esposizione che non produce sintomi in un soggetto non esposto precedentemente potrebbe produrre gravi sintomi in un individuo precedentemente esposto a piccole dosi. Leptophos (Phosvel), trichlorphon (Dipterex), e diclorvos (Divipan) possono causare danni ai nervi periferici con persistente debolezza muscolare (Dreisbach & Robertson 1987).

In un'intossicazione acuta le prime 4-6 ore sono le più critiche. Se c'è un miglioramento dei sintomi dopo il trattamento iniziale del paziente è quindi molto probabile che sopravviva se si continua il trattamento adeguato. La tossicità ritardata rappresenta una comparsa di effetti sul sistema nervoso centrale e periferico che si

INTERFERENTI ENDOCRINI ■ SCHEDE MONOGRAFICHE

presentano giorni o settimane dopo l'esposizione. Ciò si può verificare in modo indipendente dagli effetti osservati nell'avvelenamento acuto dovuto a inibizione della colinesterasi. La morte in caso di esposizione massiccia è di solito correlata al collasso delle vie respiratorie, che riflettono la depressione del centro respiratorio, debolezza dei muscoli della respirazione, broncocostrizione ed eccessive secrezioni polmonari. La morte può derivare anche da arresto cardiaco, a causa di aritmie cardiache e di vari gradi di blocco cardiaco.

Gli effetti sistemici sono generalmente indipendenti dalla via di assorbimento, ma la sequenza e i tempi possono essere diversi. Subito dopo l'esposizione sono attesi i sintomi respiratori ed oculari, mentre quelli gastrointestinali e la sudorazione localizzata probabilmente compariranno rispettivamente dopo esposizione orale e cutanea. A seguito di ingestione, la comparsa dei sintomi è di solito rapida, da pochi minuti a 1-3 ore. Gli effetti clinici variano a seconda della quantità ingerita. Tutti i sintomi e i segni si possono verificare in varie combinazioni e si possono manifestare in tempi diversi, che vanno da pochi minuti a molte ore, a seconda della sostanza chimica, della dose, e della via di esposizione. Lievi intossicazioni possono includere solo segni e sintomi muscarinici e nicotinici. Nei casi gravi c'è sempre il coinvolgimento del SNC e il quadro clinico è dominato da insufficienza respiratoria, talvolta edema polmonare, a causa della combinazione di tutti e tre i tipi di effetti.

Cardiovascolari

Possono verificarsi aritmie cardiache, vari gradi di blocco cardiaco, e arresto cardiaco. Disturbi del ritmo cardiaco si verificano con una frequenza inferiore al 5%. Questi sono di molti tipi, come i disturbi del ritmo ventricolare, alterazioni dei segmenti ST, onde T, prolungamento dell'intervallo QT, blocco cardiaco completo, e asistolia. Tachicardia e alterazioni ST-onda possono anche essere indotte da ipossia (Gallo & Lawryk 1991). I pazienti possono avere elevata pressione sanguigna e tachicardia (effetti nicotinici), piuttosto che bradicardia o ipotensione (effetti muscarinici), in funzione dell'equilibrio tra i recettori muscarinici e nicotinici (Ellenhorn et al. 1997).

Respiratori

L'esposizione può determinare effetti sulla muscolatura liscia del tratto respiratorio con conseguente broncocostrizione, aumento dell'attività della ghiandola secretoria ed edema polmonare. L'immediata causa di morte è l'asfissia. A ciò contribuiscono i fattori muscarinici con broncocostrizione e aumento delle secrezioni bronchiali. L'azione nicotinic porta

invece alla paralisi dei muscoli respiratori e alla depressione del centro respiratorio.

Neurologici

Nel sistema nervoso centrale si può verificare depressione del centro respiratorio. L'accumulo di acetilcolina nel SNC è ritenuta responsabile di tensione, ansia, irrequietezza, insonnia, mal di testa, instabilità emotiva e nevrosi, eccesso di sogni e incubi, apatia e confusione, eloquio confuso, tremore, debolezza generalizzata, atassia, convulsioni, coma (Echobichon 1996).

I cambiamenti sono stati associati con una diminuzione della colinesterasi nel plasma o nei globuli rossi e si manifestano come alterazioni di performance psicomotoria, memoria, parola e stato d'animo, con depressione, ansia e irritabilità. Psicosi confusionale acuta di breve durata si è verificata a seguito di prolungata irrorazione con diazinone in un lavoratore agricolo (Minton & Murray 1988).

Nel sistema nervoso periferico solo pochi pesticidi organofosforici (mipafox, leptophos, merphos, trichlorphon, CPF) hanno prodotto effetti ritardati dopo una neuropatia iniziale, a quanto pare estranei all'azione anticolinesterasica (Hayes 1991). Nell'uomo, il ritardo si può manifestare fino a 4 settimane dopo la prima esposizione. I primi sintomi sono spesso formicolio e sensazione di bruciore alle estremità degli arti, seguita da debolezza degli arti inferiori e atassia. Questo può progredire ad una paralisi che, in casi gravi, colpisce anche gli arti superiori. I bambini sono meno gravemente colpiti rispetto agli adulti. Il recupero è lento e raramente completo negli adulti. Con il passare del tempo, i cambiamenti vanno da un quadro clinico flaccido a un tipo di paralisi spastica (WHO 1986). In assenza di un'intossicazione acuta può essere necessario distinguere questa neuropatia da altre neuropatie come la sindrome di Guillain-Barré e la degenerazione combinata sub-acuta.

Nel sistema nervoso autonomo, a seconda della gravità dell'avvelenamento, si possono verificare effetti muscarinici e nicotinici.

Scheletrici e della muscolatura liscia

Possono verificarsi fascicolazioni muscolari seguite da debolezza profonda e infine da paralisi flaccida. Le terminazioni nervose colinergiche della muscolatura liscia e delle ghiandole sono meno sensibili di quelle dei muscoli scheletrici ad un blocco da eccesso di acetilcolina. Pertanto, avvelenamento, broncospasmo, crampi intestinali e secrezioni eccessive, spesso persistono dopo che la debolezza dei muscoli volontari è diventata grave. Si possono anche verificare la contrazione della muscolatura liscia della vescica e tenesmo (Gallo & Lawryk 1991). La rabdomiolisi è una complicazione ben nota delle intossi-

cazioni gravi e sembra essere anche relativamente frequente nei casi di gravi intossicazioni. In fase acuta ciò può causare insufficienza renale acuta e fallimento nelle successive fasi di paresi se non trattata correttamente.

Gastrointestinali

Le manifestazioni gastrointestinali sono solitamente le prime a comparire dopo ingestione e alcune di loro forse a causa di azioni locali anti-colinesterasiche del tratto gastrointestinale. Questi sintomi includono aumento del tono e della peristalsi gastrointestinale, nausea, vomito, crampi addominali, diarrea, tenesmo, e defecazione involontaria.

Epatici e pancreatici

In avvelenamenti da parathion e da un'ampia gamma di composti estranei, sono spesso elevati i livelli nel siero di creatinina sierica, creatinina fosfochinasi, alanina aminotransferasi. La lattato deidrogenasi (LDH) e l'aspartato siero aminotransferasi non sono sottoposte nei muscoli ad una variazione parallela a quella della creatinina. Ciò esclude un importante coinvolgimento del fegato nel danno ipossico ai muscoli striati. Tuttavia si può verificare un temporaneo danno al fegato (aumento di urobilinogeno urinario, o escrezione ritardata di bromosulfotaleina) (Gallo & Lawryk 1991). In condizioni di grave avvelenamento spesso si manifestano episodi transitori di iperglicemia e glicosuria (Namba et al. 1971). A seguito di contaminazione per ingestione si può manifestare pancreatite indolore con esito fatale, anche se tutti i bambini coinvolti in uno studio hanno presentato un completo recupero (Ellenhorn et al. 1997).

Urinari

Un'insufficienza renale acuta è stata descritta in un paziente esposto a malathion spray (Reynolds 1996). La rabdomiolisi è una complicazione ben nota nelle intossicazioni gravi e sembra essere anche relativamente frequente nei casi di grave intossicazione da pesticidi organofosforici, compreso il diazinone. Nella fase acuta può causare insufficienza renale acuta e in fasi successive, se non trattata correttamente, paresi (Abend et al. 1994). Altri sintomi possono includere stranguria e minzione frequente e involontaria, anche a causa della contrazione della muscolatura liscia del vescica.

Dermatologici

Effetti locali di esposizione cutanea sono sudorazione localizzata e dermatite da contatto. Possono essere associati con fascicolazioni nel sito di contatto (Reichert et al. 1978).

6. Clorpirifos e clorpirifos-metile

Effetti locali su occhi, orecchie, naso, gola

L'esposizione può dare effetti locali sulla muscolatura liscia degli occhi provocando miosi precoce e visione offuscata ed anche congiuntiviti e cheratite. Possono essere colpite le ghiandole di secrezione delle vie respiratorie così come i muscoli lisci degli occhi. L'esposizione per inalazione può provocare scolo nasale acquoso e iperemia, rinite acuta e faringite (Ecobichon 1996).

Ematologici

In pazienti avvelenati con paration sono state descritte anomalie della coagulazione del sangue (Von Kaulla & Holmes 1961) che includono sia ipo- che ipercoagulabilità, con rispettivo prolungamento o abbreviamento dei tempi di protrombina. Tuttavia, a causa della bassa incidenza di questi risultati (<1,2%), è improbabile che tali cambiamenti siano clinicamente significativi.

Immunologici

Alcuni deficit nella risposta immunitaria sono stati riportati in animali trattati con quantità di pesticidi organofosforati che deprimono i livelli di acetilcolinesterasi (WHO 1986).

Metabolici

Nei casi di avvelenamento più gravi possono manifestarsi disturbi metabolici acido-base come l'acidosi metabolica.

Associato ad avvelenamento da organofosforici può verificarsi squilibrio elettrolitico e dei fluidi con vomito e diarrea. L'ipopotassiemia è invece comune negli avvelenamenti da inorganofosforici.

Reazioni allergiche

Dopo esposizione al malathion è stata segnalata sensibilità allergica da contatto (Milby & Epstein 1964). Sono stati anche descritti casi sporadici di dermatite da contatto che però sembrano dipendere da sensibilità individuale e non sono rappresentativi del quadro clinico abituale di esposizione dei pesticidi organofosforici (Gallo & Lawryk 1991).

Sono stati documentati, sia negli animali da laboratorio, sia nell'uomo, effetti dei pesticidi OP sull'attività dei leucociti neutrofili, sui macrofagi, sulla produzione di anticorpi e di interleuchine (IL 2), sul complemento serico e sulla proliferazione di cellule linfatiche T indotta da concanavalina A (Con A) e fitoemoagglutinina (PHA) (Quing Li 2007). In individui esposti a CPF è stata inoltre rilevata una maggiore frequenza di allergie/intolleranze ad antibiotici, una diminuzione di cellule CD5, un

INTERFERENTI ENDOCRINI ■ SCHEDE MONOGRAFICHE

aumento di cellule CD26 e di anticorpi, suggerendo l'ipotesi di incremento dell'insorgenza di patologie autoimmuni (Trasher 2002).

Sindrome Intermedia

Pochi pesticidi organofosforici causano la cosiddetta "Sindrome intermedia" apparentemente indipendente dall'inibizione dell'acetilcolinesterasi che si verifica da 1 a 8 giorni seguenti l'avvelenamento, dopo un iniziale miglioramento. Si manifesta con debolezza muscolare che conduce a paralisi e a improvviso arresto respiratorio. Ciò si verifica occasionalmente in pazienti che non hanno avuto bisogno di ventilazione o che sono stati scollegati dalla ventilazione anticipatamente perché la loro condizione è apparsa migliorare dopo un periodo di terapia e respirazione artificiale. Si esprime come una perdita improvvisa delle capacità respiratorie associate a debolezza profonda di alcuni muscoli respiratori e del collo. La sindrome è stata originariamente osservata dopo l'ingestione di pesticidi organofosforici altamente lipofili come il fention, ma essa non si limita solo ad alcuni composti (De Bleecker et al. 1993). Se non immediatamente mortale, la condizione di solito regredisce in pochi giorni di re-intubazione (Senanayake & Karalliedde, 1987, 1992). L'effetto può essere il risultato di una prolungata stimolazione colinergica nicotinic che causa paralisi funzionale della trasmissione neuromuscolare (Besser et al. 1989), seguita da locale danno necrotico nella placca motrice del motoneurone (Dettbarn 1984) e nel muscolo scheletrico (Bright et al. 1991; Karalliedde & Henry 1993).

Polineuropatia ritardata indotta da organofosforici

Estranea all'inibizione dell'acetilcolinesterasi si verifica a causa dell'inibizione degli altri enzimi, in particolare esterasi target neurotossiche. La polineuropatia ritardata indotta da organofosforici è caratterizzata dalla demielinizzazione dei nervi lunghi, quando si verifica una disfunzione neurologica 1-3 settimane dopo un'esposizione acuta, da disfunzione motoria, ma anche da disfunzioni sensoriali, che possono essere croniche o ricorrenti.

Cancerogenicità

La classificazione dell'USEPA indica che il CPF non mostra alcuna evidenza di cancerogenicità (US EPA 1994), ma alcuni studi suggeriscono collegamenti sia con il cancro al polmone (Lee et al. 2004), sia alla prostata (Alavanja et al. 2003).

Lee et al. (2004) hanno infatti valutato l'incidenza di cancro in 54.383 lavoratori agricoli esposti al CPF in Iowa e nel Nord Carolina raccogliendo informazioni

dettagliate sui pesticidi a cui erano stati esposti e il loro stile di vita mediante questionari compilati al momento dell'iscrizione (Dicembre 1993-dicembre 1997). La regressione di Poisson è stata utilizzata per valutare l'associazione fra l'esposizione al CPF e l'incidenza del cancro dopo aggiustamenti per eliminare potenziali fattori di confusione. Tutti i test statistici sono stati svolti in doppio. Fino al 2001 sono stati diagnosticati 2070 casi di neoplasie maligne. Il rapporto tra il tasso di tumori dei lavoratori esposti al CPF e quelli non esposti al CPF è stato 0,97 (95% intervallo di confidenza 0,87-1,08). Per la maggior parte dei tumori analizzati, non è stato riscontrato alcun rapporto esposizione-risposta significativo. Tuttavia, l'incidenza del cancro ai polmoni è stata statisticamente significativa sia rispetto ai giorni di esposizione al CPF (P_{trend} 0,002) sia all'intensità dell'esposizione (P_{trend} 0,036). In seguito a correzioni per l'esposizione ad altri pesticidi e per i fattori demografici, gli individui con la massima quartile di giorni di esposizione al CPF (> 56 giorni) presentavano un rischio relativo di tumore al polmone 2,18 volte (95% intervallo di fiducia 1,31-3,64) quello di coloro non esposti al CPF.

Il numero dei lavoratori agricoli esposti al CPF di questo studio, in uno studio successivo (Lee et al. 2007) è stato poi disaggregato in terzili di esposizione cumulativa crescente. I decessi accertati dal 1993 al 2001 furono 588. La regressione di Poisson mostrò un RR di morte che era significativamente aumentato (di circa due volte) solo per suicidio e cause traumatiche. Questi eccessi potevano essere in relazione alla depressione o altri sintomi neurocomportamentali imputabili al CPF.

Da studi successivi effettuati su lavoratori agricoli esposti a pesticidi organofosforici sono stati riscontrati dati significativi di incidenza di leucemia (Mahajan 2006), cancro polmonare e tumori linfo-emopoietici (Beane Freeman 2005), tumore del colon e della prostata (Mahajan 2006) e linfoma non-Hodgkin (Bonner 2007).

Inoltre, secondo il Journal of Pesticide Reform, gli xileni, utilizzati come solventi in alcuni prodotti contenenti CPF, hanno causato un aumento del tasso di leucemia tra i lavoratori esposti. Gli xileni possono anche essere co-cancerogeni e aumentare il numero di tumori della pelle causata da altre sostanze cancerogene negli animali da laboratorio.

Nel 2005 Lee et al. condussero uno studio caso-controllo su una popolazione nel Nebraska orientale per valutare il rischio di glioma nell'adulto in relazione all'uso di pesticidi in agricoltura. Furono condotte interviste telefoniche comprendendo nello studio uomini e donne con una diagnosi di glioma (circa 251 persone in tutto) scoperto tra il 1988 e il 1993 e controlli (circa 498 persone) selezionati random dalla stessa area geografica. Tra gli uomini, la residenza in zone agricole e l'impiego in attività inerenti l'agricoltura, nonché la durata

della loro attività lavorativa furono associate con un aumento significativo del rischio di glioma; queste corrispondenze non furono rilevate tra le donne impiegate nelle stesse attività lavorative. Le associazioni positive tra esposizione a pesticidi e rischio di glioma furono osservate in particolare per alcuni composti tra cui il CPF.

Per quanto riguarda la correlazione tra esposizione ai pesticidi OP e tumore alla mammella, Teitelbaum et al., in uno studio pubblicato nel 2006 valutarono l'associazione tra utilizzo residenziale di pesticidi e rischio di tumore alla mammella tra donne residenti a Long Island, New York. Essi condussero uno studio caso-controllo dove furono arruolate 1508 donne con cancro della mammella diagnosticato tra agosto 1996 e giugno 1997 e 1556 donne selezionate a random.

I risultati dell'indagine suggerivano una correlazione tra rischio di sviluppo di cancro alla mammella e l'utilizzo residenziale dei pesticidi, in particolare con il loro uso nei giardini.

Una minore associazione invece fu osservata per l'utilizzo di repellenti per insetti o prodotti antiparassitari per gli animali domestici.

Alavanja et al. in uno studio pubblicato nel 2004, esaminarono la relazione esistente tra l'esposizione a 50 pesticidi ampiamente utilizzati in agricoltura e l'incidenza di tumore polmonare includendo nello studio 57284 applicatori di pesticidi e 32333 mogli di applicatori senza una storia precedente di cancro al polmone. L'arruolamento fu effettuato tra il 1993 e il 1997 con il completamento di un questionario auto-somministrato. Due erbicidi ampiamente utilizzati, metolaclo e pendimetalina e due insetticidi, clorpirifos e diazinon mostravano una relazione tra esposizione e aumentato rischio di cancro polmonare.

È poi molto importante considerare gli effetti cancerogeni causati da pesticidi OP, tra cui il CPF, sui bambini, la cui esposizione può derivare dall'utilizzo di queste sostanze in case, scuole, altre strutture, giardini, cibo e acqua contaminata nonché dal loro utilizzo in agricoltura e dall'esposizione mediata dai genitori e parenti esposti in campo lavorativo. Un ruolo importante sembra essere rivestito dalla esposizione dei genitori e in particolare dalle madri durante il periodo di gravidanza e preconcezionale. I tumori maligni osservati nei bambini esposti a pesticidi e riportati in differenti studi comprendono leucemie, neuroblastoma, tumore di Wilms, sarcoma dei tessuti molli, sarcoma di Ewing, linfoma non Hodgkin, cancro al cervello, colon-retto e testicoli. Gli studi a riguardo in ogni caso sono stati limitati da diversi fattori quali informazioni non specifiche sull'esposizione ai pesticidi, un numero ridotto di soggetti esposti e i potenziali *bias*; nonostante ciò è chiaro da quanto riportato in molti studi che il rischio di sviluppo di tumori maligni nei bambini in seguito ad esposizione a pesticidi OP è di maggiore entità rispetto a

quello osservato negli adulti indicando che i bambini sono molto più sensibili agli effetti cancerogeni dei pesticidi stessi. Ricerche future dovranno includere uno studio più approfondito dell'esposizione, una valutazione del rischio in relazione all'età e le possibili interazioni genetica-ambiente.

7. Meccanismo di azione come interferente endocrino

Studi effettuati sugli animali con parathion marcato radioattivamente hanno dimostrato che questo composto è in grado di superare la barriera placentare (Ville-neuve et al. 1972). Studi in donne sane hanno dimostrato livelli di caduta della colinesterasi nel primo trimestre di gravidanza (range 17-46%) ed un ritorno a livelli normali dal terzo trimestre. È un fenomeno non conosciuto di caduta dei livelli dell'attività plasmatica della colinesterasi in gravidanza per il quale non è stato ipotizzato nessun meccanismo. Tuttavia questo fatto deve essere considerato quando vi è un calo inspiegabile della colinesterasi (Howard et al. 1978).

Alcuni ricercatori hanno osservato mutamenti strutturali nello sviluppo del cervello di prole femminile dei ratti esposti al CPF a dosi di 1 mg/kg/giorno, la dose più bassa somministrata. I ricercatori hanno osservato l'inibizione di ChE in plasma e globuli rossi alla stessa dose. I maschi e le femmine sono stati esposti a 5 mg/kg/giorno ed hanno mostrato una diminuzione del peso corporeo, una diminuzione del consumo di cibo, la riduzione della prole, ritardo nello sviluppo, diminuzione del peso e cambiamenti morfologici del cervello.

Sono stati osservati gli effetti neurotossici dell'esposizione al CPF sulla riproduzione e lo sviluppo di ratti, topi e conigli. Gli effetti neurotossici osservati includono: morte programmata delle cellule, sviluppo di un neurone alterato, trascrizione del gene e differenziazione alterata delle cellule, sintesi alterata di DNA, RNA e proteine, effetti avversi sulla riproduzione cellulare e cambiamenti nello sviluppo del cervello.

Alcuni studi hanno mostrato gli effetti sullo sviluppo neurocomportamentale causato da livelli di esposizione inferiori a quelli che causano l'inibizione del dolore, ma il meccanismo che regola questi effetti non è ben conosciuto. I ricercatori hanno proposto che il CPF possa svolgere un ruolo nella neurotossicità inerente lo sviluppo dovuta al rapporto fra l'esposizione a bassi livelli di CPF ed alcuni effetti osservati sullo sviluppo neurocomportamentale.

In studi sulla riproduzione delle anatre di germano reale alimentate con diete contenenti concentrazioni di CPF di 60, 100 e 125 ppm sono stati osservati ridotta produzione di uova, assottigliamento dei gusci, riduzione della prole e morte. Alla dose più elevata è stato

osservato un rapporto di riproduzione dell'84% del numero delle uova ed un rapporto di riproduzione dell'89% del numero di giovani.

In studi di alimentazione animale, bassi livelli di parathion nella dieta non hanno influenzato la riproduzione, ma a livelli più elevati, prossimi a quelli pericolosi per gli adulti, le gravidanze sono portate a termine, ma i cuccioli possono morire (Gallo & Lawryk 1991).

La maggiore suscettibilità dei vitelli da ristallo si pensa sia dovuta ai loro enzimi microsomiali poco sviluppati (Benke & Murphy 1975).

Effetti teratogeni sono stati riportati nei suini per il trichlorofon, ma molti meno per altri composti (WHO 1986).

A una donna di 24 anni al terzo mese di gravidanza, che si iniettò il malathion in un tentativo di suicidio è stato effettuato due mesi dopo un aborto terapeutico poiché il proseguimento della gravidanza è considerato pericoloso, anche se lo stato del feto non era stato descritto (Gadoth & Fisher 1978). In due pazienti nel loro secondo e terzo trimestre di gravidanza che avevano ingerito pesticidi organofosforici in un tentativo di suicidio (Karalliedde et al. 1988) il recupero è stato completo e la gravidanza è stata portata a termine inalterata attraverso la gestione degli effetti colinergici acuti e delle fasi intermedie di avvelenamento. Weis et al. (1983) hanno riferito di una paziente di 21 anni, che era a circa 34-35 settimane di gravidanza, ricoverata in ospedale con segni di grave avvelenamento da pesticidi organofosforici. Il taglio cesareo è stato effettuato 11 ore dopo l'ammissione per consentire alla madre un dosaggio ottimale di atropina. I livelli di acetilcolinesterasi erano meno del 2% del normale nel neonato e l'infusione di atropina è stata somministrata per otto giorni. Sia la madre che il bambino hanno recuperato senza incidenti e sono stati dimessi 30 giorni dopo il ricovero (Weis et al. 1983).

Molti pesticidi organofosforici sono stati testati per il loro potenziale mutageno. Non possono essere fatte generalizzazioni poiché solo alcuni composti sono mutageni mentre altri non lo sono.

Nell'ultimo decennio sono stati condotti numerosi studi sperimentali sulla neurotossicità del CPF in roditori di laboratorio. È stato osservato che la neurotossicità neonatale del CPF si verifica per esposizioni a dosi che non producono intossicazione sistemica, e in assenza di inibizione significativa della AChE cerebrale.

Studi condotti sui ratti hanno dimostrato che l'esposizione ad una dose sub-tossica di CPF, durante fasi diverse del periodo perinatale (GD17-PND14), non interferisca solo con la neurotrasmissione colinergica, ma determini una modificazione a lungo termine nella trasmissione serotoninergica (5HT) in particolare per esposizioni durante la fase prenatale e/o neonatale precoce. Nel sistema nervoso centrale (SNC) la serotonina

è coinvolta nella regolazione del comportamento aggressivo e sessuale e la riduzione nei livelli fisiologici di questo neurotrasmettitore è associata a disturbi neuropsichiatrici come depressione e ansia.

In uno studio effettuato in topi esposti nel periodo prenatale a CPF si è voluto verificare se, rispetto ai controlli, fossero modificate le risposte comportamentali all'agonista serotoninergico fluvoxamina, che inibisce la ricaptazione della serotonina a livello sinaptico.

Femmine gravide di topo CD-1 sono state sottoposte a somministrazione orale di 6 mg/kg di CPF dal quindicesimo al diciottesimo giorno di gestazione. Questa dose non induce tossicità sistemica nelle madri, non influenza il peso dei piccoli alla nascita e non provoca inibizione della AChE sierica o cerebrale nella progenie.

Per ogni nidiata sono stati saggiati maschi e femmine in età adulta sia con il test di Porsolt (24 maschi e 12 femmine), sia con il test di aggressività materna (25 femmine). Il test di Porsolt è ampiamente validato in letteratura ed è utilizzato per saggiare gli effetti antidepressivi degli inibitori della ricaptazione della serotonina come la fluvoxamina, che riducono significativamente nelle femmine di topo in allattamento le risposte di difesa del nido verso un maschio adulto.

I risultati hanno indicato che la fluvoxamina, somministrata alla dose di 30 mg/kg 30 minuti prima del test riduceva significativamente sia l'immobilità che il *floating* nei topi di controllo, ma non aveva effetto negli animali esposti al CPF. Tale effetto non si osservava nel test di aggressività materna: la fluvoxamina riduceva efficacemente le risposte di difesa del nido nelle femmine in allattamento, indipendentemente dal trattamento prenatale ricevuto.

Questi risultati preliminari indicano che una breve esposizione prenatale al CPF riduce marcatamente in età adulta la risposta comportamentale a un farmaco antidepressivo nel test di Porsolt. I meccanismi alla base di questa alterazione devono essere indagati più approfonditamente, anche rispetto al ruolo della serotonina nella modulazione degli stati affettivi/emozionali e dei meccanismi neuroendocrini associati a questi stati.

Nel 2001 l'EPA ha introdotto forti restrizioni nell'uso del CPF e del m-CPF per la loro potenziale elevata attività neurotossica sugli organismi in via di sviluppo.

Studi sperimentali mostrano che i loro effetti sono particolarmente importanti sui soggetti più vulnerabili come le donne in gravidanza, e quindi i feti ed i bambini e che in queste fasi il CPF può interferire in maniera permanente con lo sviluppo neurocomportamentale (Venerosi et al. 2008).

Numerosi pesticidi agiscono come Interferenti Endocrini (IE) (Mantovani et al. 2008), ma non era ancora stato verificato se gli organofosforici avessero la capacità di alterare i meccanismi di regolazione ormonale.

Recentemente alcuni studi hanno dimostrato che nelle femmine di topo l'esposizione in gravidanza e/o

neonatale provoca ipotiroidismo, riduzione dei livelli degli ormoni tiroidei e danni visibili nel tessuto ghiandolare. Anche nella prole, sia nel periodo perinatale, sia in piena maturità sessuale, si riscontrano alterazioni del tessuto tiroideo e livelli ormonali simili a quelli osservati nelle madri (De Angelis et al. 2009).

Sono state osservate anche variazioni permanenti della produzione, nell'ipotalamo, dei regolatori neuroendocrini ossitocina e vasopressina i cui livelli sono rispettivamente aumentati e diminuiti (Tait et al. 2009). Queste alterazioni sono prodotte da dosi di CPF inferiori alla soglia di tossicità per il sistema nervoso.

In questi studi gli animali, esposti al pesticida solo nelle prime fasi della vita, in particolare durante la gravidanza, in età adulta hanno manifestato un'alterazione persistente della programmazione dello sviluppo dell'organismo; i maschi inoltre sembrano essere più sensibili ad entrambi gli effetti.

Le alterazioni tiroidee nelle madri e nella prole possono determinare modificazioni nella regolazione dei processi di crescita e di sviluppo che probabilmente influenzano anche altri processi, incluso quello riproduttivo, sul quale il CPF non sembrava avere alcun effetto. Inoltre, le variazioni dei livelli dei neurotrasmettitori ipotalamici presuppongono un'implicazione nel controllo dei meccanismi di regolazione in particolare nell'interazione tra ipotalamo ed ipofisi.

Il CPF può quindi essere considerato un IE, con meccanismi ed effetti a lungo termine sulla regolazione neuro-endocrina e tiroidea ancora in parte sconosciuti.

Questo meccanismo di azione potrebbe riguardare anche altri pesticidi organofosforici costituendo un problema per la sicurezza alimentare che è necessario affrontare tenendo conto dei limiti massimi di residui per i pesticidi negli alimenti, al fine di tutelare i soggetti maggiormente suscettibili come il feto e il bambino. Sarebbe inoltre opportuno valutare la presenza negli alimenti di più pesticidi aventi lo stesso meccanismo d'azione e le loro eventuali interazioni sinergiche.

Numerosi studi effettuati su roditori di laboratorio hanno dimostrato che nel periodo neonatale il CPF è neurotossico a dosi che non inducono intossicazione sistemica, e in assenza di inibizione significativa dell'AChE cerebrale. Il CPF inibisce la replicazione cellulare a dosaggi poco più bassi di quelli che determinano tossicità sistemica soprattutto mediante meccanismi indipendenti dall'effetto sull'AChE. A dosi inferiori il CPF influenza numerosi processi cellulari fondamentali per lo sviluppo cerebrale (sintesi del DNA, crescita assonale e sistema dei secondi messaggeri).

Questi effetti si manifestano indipendentemente da modificazioni morfologiche definite, ma a lungo termine esercitano comunque un'influenza sul comportamento. Roditori neonati esposti a dosi sub-tossiche di

6. Clorpirifos e clorpirifos-metile

CPF (1-6 mg/kg) hanno manifestato alterazioni nel comportamento (attività esplorativa, alcune funzioni cognitive, e risposta a stimoli ambientali significativi) a partire dall'età giovanile fino all'età adulta.

Gli effetti comportamentali sembrano essere indipendenti dall'attività dell'enzima AChE, ma potrebbero invece essere associati all'interferenza di questo pesticida con lo sviluppo di processi mediati dalla serotonina, un neurotrasmettitore coinvolto nella regolazione dei comportamenti sociali.

Studi recenti effettuati su topi CD1 hanno evidenziato che la somministrazione di CPF, in fase prenatale o neonatale, aumenta i livelli di aggressività intraspecifica tra maschi e modifica le risposte sociali e materne nelle femmine.

In base agli effetti osservati relativamente alle competenze sociali e riproduttive, sembrerebbe che il CPF possa interferire con alcuni meccanismi neuroendocrini di regolazione del comportamento. L'ipotesi è che l'esposizione perinatale al CPF determini effetti a lungo termine, soprattutto negli individui di sesso maschile, sia sui livelli degli ormoni tiroidei (T3 e T4), sia sulla morfologia della tiroide. Probabilmente questi effetti dipendono dal lieve ipotiroidismo delle femmine esposte al CPF alla fine della gravidanza.

In questi stessi individui in età adulta sono stati anche misurati i livelli ipotalamici di ossitocina, vasopressina e prolattina. Ossitocina e vasopressina a livello cerebrale agiscono da neurotrasmettitori coinvolti nella regolazione dei comportamenti sociali, agonistici e parentali; quando invece sono rilasciate nella circolazione sanguigna si comportano da ormoni che controllano diversi processi fisiologici come la secrezione di latte nella ghiandola mammaria (ossitocina) o la regolazione dei fluidi corporei (vasopressina).

In topi esposti a CPF nel periodo perinatale i livelli di vasopressina diminuivano e quelli di ossitocina aumentavano in modo significativo, senza alcun effetto sui livelli di prolattina. Questi dati dimostrano che il CPF si comporta come un IE, poiché influenza sia i livelli di neuropeptidi ipotalamici con un ruolo fondamentale nei meccanismi di regolazione ormonale, sia la morfologia e la funzionalità della tiroide, con presumibili conseguenze a lungo termine sulla regolazione neuro-endocrina e sullo sviluppo psico-sociale dell'individuo.

Sono stati effettuati studi sulle alterazioni della struttura della cromatina degli spermatozoi di uomini professionalmente esposti ad una miscela di organofosforici (Sánchez-Pena et al. 2004), per valutare se queste alterazioni possano compromettere la fertilità maschile e lo sviluppo della prole.

Per stimare la suscettibilità alla denaturazione *in situ* acido-indotta della struttura della cromatina è stato utilizzato un saggio di struttura della cromatina spermatica (SCSA), mentre per valutare l'esposizione sono stati mi-

INTERFERENTI ENDOCRINI ■ SCHEDE MONOGRAFICHE

surati i livelli urinari degli alchilfosfati (DAP). Il metabolita maggiormente trovato nelle urine è stato il dietil-tiofosfato (DETP).

Sono stati utilizzati soprattutto derivati dall'acido tiosforico e la struttura della cromatina è risultata alterata nella maggior parte dei campioni.

Circa il 75% dei campioni di sperma sono risultati scarsamente fertili (Indice di frammentazione % [DFI] > 30%), rispetto a quelli di individui non esposti professionalmente (valori medi % DFI = 9,9%). Nell'analisi del liquido seminale la maggior parte dei valori sono stati trovati nella norma, mentre la presenza di cellule immature (CIG) è risultata superiore ai valori di riferimento nell'82% dei campioni.

Non ci sono state significative associazioni dirette tra le concentrazioni urinarie di DETP e valori medi di DFI%, dopo aggiustamento per i potenziali fattori di confondimento, tra cui il CIG. Ciò suggerisce che l'esposizione agli OP altera la condensazione della cromatina spermatica, che potrebbe tradursi in un aumento del numero di cellule con una maggiore suscettibilità alla denaturazione del DNA. Questi dati sembrano confermare che la cromatina spermatica umana è un bersaglio sensibile agli OP con esiti avversi sulla riproduzione.

Effetti sulla riproduzione

Difetti alla nascita

Numerosi studi (Engel 2000; Garry 2002a; Garry 2002b; Loffredo 2001; Shaw 1999; Garcia-Rodriguez 1996; Garcia 1998; Garcia 1999; Rojas 2000; Medina-Carrilo 2002; Kristensen P 1997; Nurminen 1995; Weidner 1998; Crisostomo 2002; Dimich-Ward 1998) hanno mostrato associazioni fra l'esposizione dei genitori ai pesticidi OP (Loffredo 2001; Shaw 1999; Garcia-Rodriguez 1996; Garcia 1998; Garcia 1999; Rojas 2000; Nurminen 1995; Crisostomo 2002) e l'aumento del rischio di difetti nella prole:

- alterazioni degli arti (Garry 2002; Shaw 1999; Kristensen 1997);
- anomalie urogenitali (Garcia-Rodriguez 1996; Kristensen 1997; Weidner 1998);
- difetti del sistema nervoso centrale (Kristensen 1997);
- labio-palato-schisi (Nurminen 1995);
- difetti cardiaci (Loffredo 2001; Shaw 1999);
- anomalie dell'occhio (Dimich-Ward 1998).

Fecondabilità (time to pregnancy)

Alcuni studi hanno mostrato una corrispondenza fra l'esposizione ai pesticidi e l'aumento del tempo di attesa della gravidanza (Abell 2000; Larsen 1998; Thonneau 1999; Thonneau 1999; Sallmen 2003; Petrelli 2001; De Cock 1994; Curtis 1999). Negli studi che non mostra-

vano questa associazione, i dati relativi all'esposizione e all'effetto erano stati rilevati nei maschi (Larsen 1998; Thonneau 1999; Thonneau 1999).

Fertilità

Per fertilità si intende la capacità di avere una gravidanza nell'arco di 1 anno ed alcuni studi hanno mostrato una corrispondenza tra l'esposizione ad OP e la diminuzione della fertilità (Tielemans 1999; Tielemans 2000; Smith 1997; Tomenson 1999; Abell 2000; Harkonen 1999; Larsen 1999; Potashnik 1995; Recio 2001; Oliva 2001; Oliva 2002; Padungtod 1999; Greenlee 2003; Heacock 1998). È stato riscontrato un aumento del rischio di sterilità nelle donne che avevano lavorato con gli OP 2 anni prima del tentativo di concepimento (Greenlee 2003). Nei maschi la riduzione della fertilità sembra essere collegata o all'aneuploidia del cromosoma sessuale nello sperma (Recio 2001), o alla disfunzione erettile (Oliva 2002).

Alterazione dello sviluppo fetale

L'alterato sviluppo fetale (basso peso alla nascita e prematurità) è fondamentale nel determinare lo stato di salute nel primo anno di vita, e costituisce un fattore di rischio di malattie croniche in età adulta (Barker 2002). Negli studi effettuati con i piretroidi e il CPF è stata riscontrata una corrispondenza fra esposizione e sviluppo fetale alterato (Crisostomo 2002; Dimich-Ward 1998; Dabrowski 2003; Hanke 2003; Hourani 2000; Karmaus 1995; Kristensen 1997; Munger 1997; Levario-Carrillo 2004; Perera 2003).

Morte del feto

In alcuni studi è stata riscontrata una correlazione tra la morte fetale (aborto spontaneo, natimortalità e morte neonatale) e l'esposizione ai pesticidi OP (Garry 2002; Crisostomo 2002; Dimich-Ward 1998; Arbuckle 2001; Arbuckle 1999; Gerhard 1998; Jarrell 1998; Petrelli 2000; Savitz 1997; Bell 2001; Pastore 1997). In uno studio condotto in Canada è stato osservato che l'esposizione prima del concepimento era associata con aborti nel primo trimestre di gravidanza, mentre l'esposizione dopo il concepimento era associata con aborto spontaneo tardivo (Arbuckle 1999). In uno studio effettuato nelle Filippine (Crisostomo 2002), è risultato che il rischio di aborto spontaneo era 6 volte maggiore nelle famiglie di agricoltori che facevano largo uso di antiparassitari rispetto alle famiglie di agricoltori che praticavano un approccio integrato contro i parassiti (riduzione dell'uso di fitosanitari).

Altre alterazioni riproduttive

Tra gli studi effettuati (Garry 2002; Levario-Carrillo 2004; Gerhard 1999; Levario-Carrillo 2001; Jarrell 2002; McGready 2001; Zeljezic 2001) solo in uno studio con-

dotto in Messico (Bell 2001) è stato riscontrato un tasso più elevato di infarto placentare in donne esposte a insetticidi organofosforici utilizzando come biomarcatore il basso livello di colinesterasi nei globuli rossi (Garry 2002; Savitz 1997).

8. Genotossicità

I pesticidi sono considerati potenzialmente mutageni. I dati sperimentali rilevano che numerosi pesticidi inducono mutazioni geniche, alterazioni cromosomiche o danni al DNA. Il potenziale genotossico dei pesticidi è comunque generalmente basso, infatti si ottengono risultati positivi solo in pochi test di genotossicità. Negli studi di biomonitoraggio di alterazioni genetiche associate a pesticidi nell'uomo sono stati trovati dei risultati positivi solo in caso di esposizione a dosi elevate e ad uso intensivo. Gli effetti genetici dipendono sia dalla quantità, sia dalla varietà delle formulazioni chimiche utilizzate. Miglioramenti nelle pratiche agricole e nelle condizioni di sicurezza sul lavoro hanno ridotto il rischio genotossico. I dati a disposizione suggeriscono un rischio trascurabile per la popolazione generale esposta a livelli molto bassi di residui di pesticidi (Bolognesi, Morasso 2000).

In alcuni studi sono state riscontrate associazioni positive fra esposizione ad antiparassitari e aberrazioni cromosomiche (Antonucci, 2000; Au 1999; Carbonell 1993; Carbonell 1995; Garaj-Vrhovac 2002; Gregio d'Arce 2000; Hoyos 1996; Joksic 1997; Kaioumova 1998; Kourakis 1996; Lander 2000; Mohammad 1995; Paz-y-Mino 2002; Varona 2003). In uno studio è emerso che gli organofosforici (Paz-y-Mino 2002) sono altamente genotossici. Nella pratica clinica, queste aberrazioni potrebbero causare aborto spontaneo, difetti di nascita, anomalie dello sperma, o aumentare il rischio di cancro.

Il meccanismo d'azione primario del CPF è legato all'inibizione dell'enzima acetilcolina-esterasi (AChE) da parte del suo metabolita attivo oxon-CPF, che è un inibitore dell'AChE circa tre volte più potente del composto d'origine. L'attivazione del CPF è dovuta ad una reazione di desolforazione mediata dal citocromo P450 (CYP).

Costa et al. nel 2003 hanno valutato su frazione microsomiale epatica di ratto il ruolo del citocromo P450 (CYP) 2D6, una isoforma caratterizzata da spiccato polimorfismo, nel catalizzare la biotrasformazione ossidativa dei pesticidi CPF (organofosforico) ed aldicarb (carbammato) in composti capaci di inibire la acetilcolina-esterasi ed indurre genotossicità; la chinina è stata utilizzata come inibitore specifico del CYP 2D6. I pesticidi sono stati posti ad incubare con i microsomi, valutando la produzione di metaboliti attivi in termini di capacità di inibire la colinesterasi su siero umano. Rispetto ai microsomi in assenza di chinina, dove la colinesterasi è stata inibita al 53% (CPF) e 57% (aldicarb)

l'aggiunta di chinina ha ridotto l'attività enzimatica rispettivamente al 72% e 27%, suggerendo che il CYP 2D6 è coinvolto nell'attivazione del CPF ma non influenza la tossicità dell'aldicarb. Inoltre, la potenziale genotossicità di questi composti è stata valutata mediante il *comet assay* su leucociti umani. La frammentazione del DNA rispetto al controllo è aumentata marcatamente in seguito all'incubazione con aldicarb e chinina, confermando che il composto originario è più tossico dei prodotti derivanti dal metabolismo citocromiale. Viceversa, il danno esercitato sul DNA dal CPF è stato sensibilmente ridotto dalla chinina, confermando il ruolo del CYP 2D6 nell'attivazione metabolica di questo pesticida. I risultati di questo studio suggeriscono che il polimorfismo del CYP 2D6 possa influenzare la tossicità degli organofosforici, ma non dei carbammati.

Suleyman et al. (2010) hanno scelto quattro pesticidi strutturalmente differenti (endosulfan, un pesticida organoclorurato, CPF, un insetticida organofosfato, cipermetrina, tipo di insetticida piretroide II, e l'acido 2,4-diclorofenossiacetico, un pesticida clorurato aromatico idrocarbonato acido) per esaminare e confrontare i loro effetti sul DNA in colture di linfociti umani mediante il *comet assay* alcalino. Sono state inoltre prese in considerazione eventuali differenze di risposta tra soggetti fumatori e non fumatori. Campioni di sangue venoso sono stati prelevati da donatori di sesso maschile sani, fumatori (n = 8) e non fumatori (n = 7). Colture primarie di linfociti sono state trattate con tre diverse concentrazioni (1, 5 e 10 µM) di endosulfan, CPF, cypermehrin, e 2,4-D. Il danno al DNA è stato valutato mediante *comet assay*. È stato rilevato un aumento del rapporto tra migrazione del DNA nelle colture di linfociti in seguito al trattamento con elevate concentrazioni di cipermetrina, 2,4-D e CPF. L'endosulfan non ha avuto effetti genotossici significativi se non a concentrazione 10 µM. Dai dati osservati si può supporre che CPF e cipermetrina siano potenzialmente più genotossici di endosulfan e 2,4-D. I risultati indicano inoltre che l'unica differenza significativa nel danno al DNA tra fumatori e non fumatori è stata osservata nel gruppo dei 2,4-D-trattati.

9. Espressione Genica e Polimorfismi

Negli organismi esposti a CPF e m-CPF i tioli sono convertiti nella forma oxon dal citocromo P450. Inoltre recenti scoperte dei ricercatori della North Carolina State University hanno evidenziato che i tioli sono in grado di disattivare gli enzimi P450 che catalizzano la desolforazione ossidativa dei composti di partenza. Di particolare interesse è l'inattivazione dei citocromi P450 3A4 e 1A2 che sono importanti nel metabolismo di testosterone ed estradiolo.

Sono state caratterizzate isoforme specifiche di alcuni enzimi polimorfici e sono state dimostrate le interazioni tra pesticidi-antiparassitari e gli enzimi che li metabolizzano. L'esposizione degli epatociti umani a CPF ha dimostrato la loro capacità di indurre isoforme CYP utilizzando il *branched chain DNA assay (bDNA assay)* per monitorare i livelli di mRNA.

Lo studio *in vitro* del metabolismo del CPF nell'uomo (Rose et al. 2006) ha dimostrato che nei microsomi del fegato umano avvengono sia la detossificazione (dearilazione), sia l'attivazione (desolforazione) del CPF. Le isoforme specifiche coinvolte nel metabolismo (CYP 1A2, 2B6, 2C9, 2C19 e 3A4) generano prodotti metabolici, anche se il rapporto tra attivazione metabolica e detossificazione varia nelle diverse isoforme. CYP2B6 e 3A4 (entrambi sono polimorfici) sono stati responsabili della formazione della maggior parte dell'attivazione delle desolforazioni dei metaboliti. L'esame di due alleli polimorfi del CYP3A4 ha dimostrato che uno era incapace di metabolizzare il CPF, mentre l'altro era meno attivo rispetto all'allele wild-type.

Il prodotto di detossificazione, TCP, si è formato più velocemente da CYP2C19, seguito da 2C9 e 3A4. Anche 2C19 è polimorfico.

Test sul metabolismo del CPF hanno dimostrato che il CYP2C19 *wild type* fornisce prodotti sia di dearilazione, sia di desolforazione, mentre le altre tre forme polimorfe generano solo prodotti di dearilazione, anche se in quantità significativamente inferiori.

Poiché le concentrazioni delle isoforme CYP presentano una grande variabilità individuale, si è cercato di determinare se le differenze nella composizione delle isoforme potrebbero contribuire a determinare, sulla base del metabolismo, differenze nella suscettibilità umana al CPF. Individui con differenti livelli di CYP2B6, 2C19, 2D6, e 3A4 sono stati selezionati per rappresentare livelli diversi di prodotti dell'attività metabolica.

In individui con elevati livelli di CYP2B6 e 3A4 ci si aspetterebbe una maggiore capacità di formare i prodotti di desolforazione rispetto a quelli con livelli più bassi di queste isoforme.

In soggetti con livelli inferiori di CYP2B6, ma con elevati livelli di CYP2C19 e 3A4, si può prevedere una maggiore quantità di prodotti di dearilazione rispetto a quelli con livelli significativamente ridotti di queste isoforme.

Anche se è stato difficile trovare individui con livelli molto diversi di CYP2B6 e 3A4, in generale, le previsioni sulla produzione dei metaboliti, cinque individui con differenti livelli di questo gruppo di enzimi, sono stati coerenti con le aspettative basate sui livelli fenotipici dell'isoforma.

Da questo e da altri studi è emerso che il rapporto tra attivazione e detossificazione dipende dalle isoforme individuali presenti in un tessuto e determina la quantità di oxon disponibile, cioè il suo grado di tossicità.

Rose et al. (2006) hanno poi effettuato ulteriori studi sui polimorfismi CYP2B6 e 2C19. I test preliminari con i campioni di fegato umano hanno individuato due polimorfismi trovati nell'allele CYP CYP2B6*6. Questo allele è stato associato, da altri, alla riduzione del metabolismo di altri substrati del CYP2B6. Poiché CYP2B6 attiva il CPF a oxon-CPF più tossico, la presenza di questo allele sembrava essere protettiva. Al contrario la presenza dell'allele wild-type CYP2B6 potrebbe tradursi in una maggiore attivazione.

Dopo che nei campioni di fegato sono stati identificati i polimorfismi sono stati preparati microsomi per testare la loro capacità di metabolizzare il CPF sulla base di genotipo. Per questi studi sono stati utilizzati campioni di fegato acquisiti dal *National Disease Research Interchange*.

In studi più recenti è stato utilizzato il DNA dei partecipanti all'Agricultural Health Study. È stata anche acquisita la linea cellulare A549 di adenocarcinoma polmonare umano per testare la sua risposta citotossica e metabolica al CPF.

Per testare l'esposizione al CPF e ai suoi due metaboliti, oxon-CPF e TCP è stata utilizzato il MTT [3 - (4,5-dimetiltiazol-2-ile) -2,5-bromuro difeniltetrazolium test]. Solo il CPF ha mostrato un effetto significativo.

Si ipotizza che la citotossicità di CPF nella linea cellulare A549 sia dovuta in parte alla produzione metabolica di zolfo reattivo durante il metabolismo dell'oxon-CPF. L'aggiunta di nicotina è risultata protettiva nei confronti della citotossicità del CPF. Questo effetto protettivo è stato trovato nella linea cellulare HepG2. Sono stati preparati microsomi dalla linea cellulare A549 ed è stata testata la loro capacità di metabolizzare il CPF. Le osservazioni effettuate sulla capacità degli OP come il CPF, nell'inibire il metabolismo umano degli ormoni steroidei, inclusi testosterone ed estradiolo, è importante in termini di analisi dei rischi per i lavoratori agricoli.

La suscettibilità agli insetticidi OP, come il CPF, può risultare dalle differenze nella detossificazione del suo metabolita attivo, oxon-CPF. La PON1 svolge un ruolo significativo nell'idrolizzare (arilesterasi) un certo numero di pesticidi OP nei loro metaboliti attivi (oxons) compreso il CPF nel suo metabolita tossico oxon-CPF. L'attività di PON1 è più elevata nel fegato e nel plasma, e tra le specie animali esistono notevoli differenze (uccelli e conigli hanno rispettivamente un'attività molto bassa e molto elevata).

La paraoxonase-1 (PON1) è una glicoproteina 355 aminoacidi, che viene sintetizzata nel fegato e secreta nel sangue, dove si associa con HDL (lipoproteine ad elevata densità) (Hassett et al. 1991). Viene codificata da un membro di una famiglia di tre geni (PON1, PON2 e PON3) che si trovano sul cromosoma umano 7 (Draganov et al. 2010). Le proteine PON presentano il 60% di identità nella

sequenza (Primo-Parmo et al. 1996). Le PON sono idrolasi con un'ampia specificità di substrati.

Il ruolo fisiologico primario di PON1 è quello di proteggere dalle modificazioni ossidative le lipoproteine a bassa densità (LDL). Le LDL ossidate giocano probabilmente un ruolo centrale nella chemiotassi della differenziazione di monociti e macrofagi, che sono eventi precoci nella progressione dell'arteriosclerosi, mentre HDL distrugge questi lipidi ossidati biologicamente attivi. PON1, associato con la particella HDL, è il principale enzima responsabile di questo effetto protettivo. PON1 protegge anche i fosfolipidi HDL dall'ossidazione (Sinan 2008).

PON1 è stata la prima delle proteine ad essere identificata, e quindi la più studiata. A differenza di PON2 e PON3 è un'esterasi efficiente sugli OP compreso il CPF (Davies et al. 1996).

I polimorfismi del promotore del gene PON1 sono responsabili di ca. il 25% della variazione della concentrazione sierica di PON1, il restante 75% di questa variazione è attribuibile ad altri fattori.

HDL, il vettore nel siero di PON1, è probabilmente un'importante determinante della concentrazione dell'enzima. Questo è dimostrato dal fatto che i livelli di PON sono ridotti nelle sindromi da deficit di HDL (James et al. 1998).

Alcuni studi hanno dimostrato che PON1 è legata alla specie HDL₂ di HDL in una particella arricchita in triacilgliceroli (trigliceridi). Gran parte delle PON1 è associata con HDL contenenti apoAI, anche se ci sono particelle contenenti PON1, apoAI e apoAII. C'è anche una sottopopolazione di HDL contenenti PON1 che è associata con apoJ (ca. il 30%) o clusterina (Pometta 1993; Kelso et al. 1994).

Un polimorfismo genetico delle arilesterasi (PON1; CPF-oxonasi) determina, nell'uomo, l'espressione di differenti livelli di attività dell'enzima. Timchalk et al. nel 2002 hanno utilizzato l'analisi Monte Carlo fisiologicamente basata su modello farmacocinetico e farmacodinamico (PBPK/PD), per valutare l'impatto della CPF-oxonasi umana su concentrazioni teoriche di oxon-CPF nel cervello. A basse dosi (5 µg/kg) il modello è insensibile alle variazioni di CPF-oxonasi. Tuttavia, all'aumentare della dose (> 0,5 mg/kg), il modello suggerisce un aumento dose-dipendente, non lineare, della concentrazione di oxon-CPF nel cervello, associata con l'attività della CPF-oxonasi. A seguito di ripetute esposizioni a dosi elevate, secondo il modello previsto, la concentrazione di oxon-CPF nel cervello era circa 8 volte superiore (5 mg/kg) rispetto ad una singola esposizione, mentre, a basse dosi (5 µg/kg), le concentrazioni cerebrali erano confrontabili a prescindere dalla durata dell'esposizione. Ciò suggerisce che a basse esposizioni di rilevanza ambientale altre vie di detossificazione delle esterasi possono compensare una minore attività della CPF-oxonasi.

Si pensava che i mammiferi potessero detossificarsi dall'oxon rapidamente, ma negli ultimi anni è diventato evidente che vi è una considerevole variabilità nei livelli di PON1 nel plasma di individui diversi che è controllata geneticamente.

La PON1 umana ha due polimorfismi nella regione codificante (Q192R e L55M) e cinque polimorfismi nella regione del promotore.

Il sequenziamento del promotore del gene PON1 ha portato alla scoperta di almeno cinque polimorfismi con diverso grado di influenza sull'espressione genica. Questi polimorfismi si trovano nelle posizioni, -909/907 (C o G), -832/824 (A o G), -162 (A o G), -126 (C o G) e -108 /-107 (C o T) (Deakin et al. 2004).

Le differenze di nomenclatura sono dovute a piccole variazioni delle sequenze studiate. Esperimenti effettuati in cellule HepG2 con il gene reporter luciferasi hanno dimostrato che i promotori contenenti i polimorfismi GAAC, al contrario di CGGT, nelle posizioni -909, -832, -162 e, -108 rispettivamente, sono fino a due volte più attivi. Queste variazioni di attività nel promotore hanno dimostrato di essere fisiologicamente rilevanti in quanto correlate con differenze significative di concentrazione e attività di PON1 nel siero (Leviev et al. 2000; Brophy et al. 2001; Suehiro et al. 2000).

Polimorfismi sono stati individuati anche nella regione 3' non tradotta del gene PON1, ma il loro significato è ancora sconosciuto (Brophy et al. 2001). L'identificazione dei polimorfismi clinicamente significativi è stata ostacolata dalla mancanza di un indicativo *linkage disequilibrium* tra tutti i polimorfismi del promotore. L'analisi degli aplotipi di due popolazioni ha dimostrato che il polimorfismo C(-108)T è il principale responsabile della variazione di PON1 nel siero, pari al 23-24% della variazione totale (Brophy et al. 2001; Deakin et al. 2003).

Brophy et al. (2001) hanno riportato anche un modesto contributo (1,1% variazione totale) del sito A(-162)G. I siti a -909 e -832 non sembrano influire sui differenti livelli di PON1 nel siero (Brophy et al. 2001; Deakin et al. 2003).

Saggi effettuati con geni reporter con regioni promotrici di varie lunghezze hanno dimostrato

che la regione di ca. 200 bp dei polimorfismi -108 e -162 è sufficiente per la trascrizione del gene PON1 (Brophy et al. 2001; Gouedard et al. 2003; Deakin et al. 2003).

L'eliminazione di questa regione abolisce completamente l'attività del promotore: questo significa che è una regione fondamentale per la regolazione del promotore.

Il polimorfismo del sito -108 è situato al centro di un sito di consenso per il legame dei fattori di trascrizione Sp1 e SP3. Questo sito di consenso è abolito dalla presenza della variazione -108T (Leviev et al. 2000; Brophy et al. 2001).

Il legame di Sp1 al sito -108 è più debole, in presenza di T al posto di C, il che suggerisce un effetto vincolante del polimorfismo sulla Sp1 (Deakin et al. 2003).

In questa regione del promotore PON1 ci sono siti multipli per Sp1, per cui è probabile che l'effetto del polimorfismo dipenda dalla posizione. La co-trasfezione del promotore PON1 in un plasmide che esprime Sp1 con una forte up-regolazione dell'attività promotore, permette di sostenere ulteriormente l'ipotesi che SP1 sia importante nell'espressione di PON1 (Kumon et al. 2003).

Il polimorfismo -162 si trova su un potenziale sito di legame di NF-1 (fattore nucleare-1), con un'elevata attività-A-variante che forma il sito e una bassa attività-G-variante che lo perturba (Brophy et al. 2001). Questo può spiegare l'effetto del cambiamento di -162 sull'espressione genica (Figura 3).

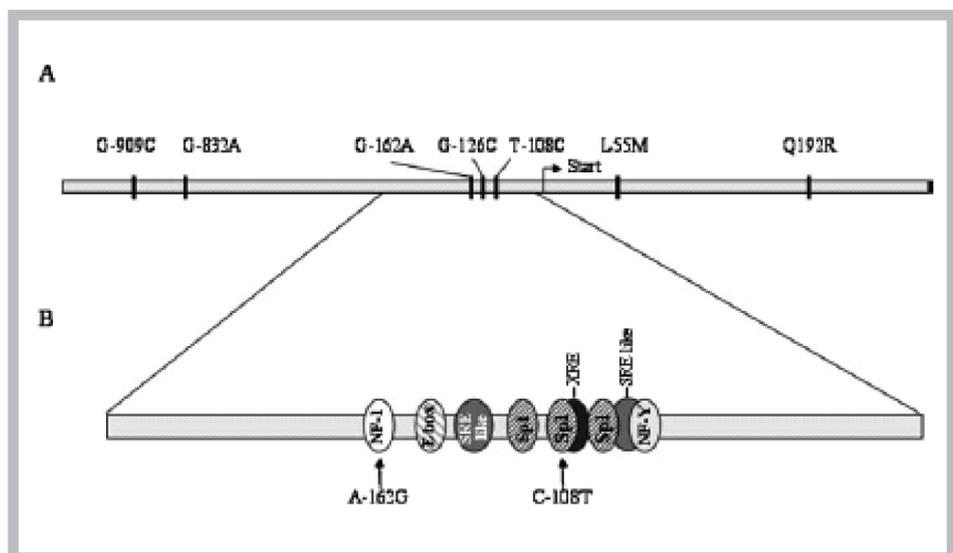


Figura 3. Regioni codificanti del gene PON1 (A) Siti dei polimorfismi nel promotore e della regione codificante del gene PON1. (B) Regione del promotore (ca. 200 bp) che è necessaria e sufficiente per la trascrizione del gene PON1. I polimorfismi -162 e -108, potenziali siti di legame per il fattore di trascrizione, sono contrassegnati con NF-1 (fattore nucleare-1) e NF-Y (fattore nucleare Y).

Il polimorfismo Q192R è responsabile delle differenti attività catalitiche verso alcuni OP, mentre il polimorfismo in posizione -108 (C/T) regola le differenze nel livello di espressione di PON1. Studi sugli animali (Costa Lucid et al. 2003) hanno dimostrato che PON1 è un fattore determinante di tossicità verso gli OP e che le specie di animali con una bassa attività PON1 hanno una maggiore sensibilità agli OP. La somministrazione di PON1 esogeno a ratti o topi li protegge dalla tossicità degli OP. I topi PON1 knockout mostrano un'elevata sensibilità alla tossicità di diazoxon e oxon-CPF, ma non del paraoxon. Saggi *in vitro* dell'efficienza catalitica di isoforme PON192 purificate per idrolisi di specifici substrati oxon ha permesso di prevedere con precisione il grado di protezione in vivo offerta da ciascuna isoforma. La minore attività di PON1 dei neonati può anche contribuire alla loro maggiore sensibilità alla tossicità degli OP.

Furlong et al. (2004) hanno studiato la variabilità genetica umana, esperimenti condotti in un modello murino progettati per fornire informazioni sulle conseguenze fisiologiche della variabilità genetica dell'enzima PON1 in popolazioni umane, e le conseguenze di questa variabilità rispetto alle interazioni gene-ambiente, in particolare il ruolo della PON1 nella protezione contro l'esposizione ad alcuni insetticidi OP ed ai loro metaboliti, compresi CPF/oxon- CPF.

Studi della variabilità genetica dell'attività di PON1 nel siero svolte nei diversi gruppi etnici indicano che bassi livelli di metabolizzazione sono caratteristici di circa la metà delle popolazioni di origine nord-europea, mentre sono pochissime le popolazioni di origine africana o asiatica che presentano questi valori (Geldmacher et al. 1988).

È stato studiato il sito polimorfico che specifica per l'aminoacido in posizione 192 dell'enzima PON1 ed è stato dimostrato che la presenza dell'allele PON1-R192 determina un'elevata attività della PON1, mentre l'allele PON1-Q192 ne determina una bassa attività.

La presenza nella posizione 192 di questa proteina dell'aminoacido glutamina (PON1-Q192) o arginina (PON1-R192) determina se la PON1 di un individuo può idrolizzare rapidamente o lentamente. Le due alloforme PON1-Q192 e PON1-R192 hanno proprietà diverse.

È stato osservato che nel plasma di alcuni individui con genotipo eterozigote alla posizione 192 (Q/R) era presente solo una alloforma. Questi individui presentavano geni PON1 che erano difettosi nella regione interessata dall'analisi del DNA (Richter et al. 1999).

I primi studi sugli effetti di un elevato livello di PON1 nella resistenza all'esposizione a CPF/oxon- CPF sono stati effettuati con esposizione cutanea e in seguito per somministrazione parenterale in conigli e topi. In questi studi elevati livelli di PON1 nel plasma hanno fornito un'eccellente protezione contro l'inibizione della colinesterasi nel cervello e nel diaframma.

Le conseguenze di bassi livelli plasmatici di PON1 sono state esaminate in topi geneticamente modificati che erano privi di fegato e di PON1 nel plasma i quali si sono rivelati fondamentali per comprendere il ruolo fisiologico di PON1 nella detossificazione da specifici composti OP, nonché la loro funzione nella protezione contro le malattie vascolari (Shih et al. 1998).

Le curve dose-risposta nei topi deficienti in PON1 hanno mostrato l'importanza della variabilità genetica di PON1 nel modulare l'esposizione all'oxon nella detossificazione del composto originale (Li et al. 2000).

I topi deficienti in PON1 sono stati poi iniettati sia con le alloforme umane purificate PON1-Q192 o PON1-R192, sia con soluzione salina ed esposti per via cutanea a CPF/oxon-CPF per saggiare l'efficacia protettiva delle alloforme.

La resistenza oxon-CPF dipende dai livelli plasmatici di PON1; inoltre gli animali trattati con PON1-R192 hanno mostrato una migliore protezione contro l'esposizione poiché sono stati molto più resistenti all'inibizione della colinesterasi rispetto agli animali trattati con PON1-Q192. Questa è una osservazione molto significativa, dato che circa il 50% degli individui di origine nord-europea sono omozigoti per PON1-Q192 (Cole et al. 2005).

I polimorfismi nel gene PON1 umano, soprattutto in posizione 192, esprimono quindi modificazioni dell'attività catalitica dell'enzima che sono stati associati con la suscettibilità alla neurotossicità degli OP. González-Horta et al. (2006) hanno valutato i fenotipi e i genotipi dei polimorfismi nelle posizioni -108 e 192 del gene PON1 per stabilire se essi sono collegati all'inibizione dell'AChE nei lavoratori agricoli esposti agli OP. Studi incrociati sono stati effettuati in 84 individui di sesso maschile (età media 42 anni) con storia di esposizione professionale a pesticidi. I partecipanti sono stati suddivisi in: irroratori (43%) e non irroratori (57%). Attraverso interviste dirette sono state raccolte informazioni sui pesticidi utilizzati, la dieta, le caratteristiche demografiche e lo stile di vita. Raccolti i campioni di sangue, l'attività dell'acetilcolinesterasi è stata determinata con il metodo di Ellman, utilizzando fenilacetato e paraoxon come substrati, mentre il genotipo di PON1 nelle posizioni -108 e 192 è stato determinato mediante PCR-RFLP. La variabilità interindividuale dell'attività di PON1 è stata individuata con una distribuzione unimodale; il range dell'attività enzimatica verso il fenilacetato è stato da 60 a 381 U/ml, e da 59 a 1559 U/l verso il paraoxon. Le frequenze alleliche sono state: 0,45 per C e 0,55 per T in posizione -108 e 0,48 per R e 0,52 per Q in posizione 192. Entrambi i polimorfismi sono stati associati con l'attività di PON1. I lavoratori agricoli hanno una minore attività dell'AChE (4,9 U/ml; $p < 0,05$) rispetto alla popolazione di controllo (5,5 U/ml) studiata

precedentemente. L'analisi multivariata ha rivelato un'attività dell'AChE inferiore tra gli irroratori (4,5 U/ml) rispetto ai non-irroratori (5,3 U/ml). Infine, gli individui con genotipo PON1-192QQ hanno mostrato il 94% di possibilità di avere minore attività dell'AChE rispetto alla media osservata nella popolazione di controllo (5,3 U/ml). L'allele QQ è stato associato ad una minore attività verso paraoxon e oxon-CPF, metaboliti dei due composti OP più utilizzati in agricoltura. Questi risultati suggeriscono che il polimorfismo 192 di PON1 può essere utilizzato come fattore di suscettibilità alla neurotossicità degli OP, considerando l'attività dell'AChE come biomarcatore nelle popolazioni professionalmente esposte.

L'alloforma R192 presenta una maggiore efficienza nell'idrolisi dell'oxon-CPF rispetto all'alloforma Q192. Cile Toby et al. (2005) hanno esaminato la rilevanza di queste osservazioni in vivo in caso di esposizione al CPF e oxon-CPF. Sono stati prodotti topi transgenici che esprimevano PON1-Q192 o PON1-R192 umani a livelli equivalenti, in assenza di PON1 murino endogeno.

I topi adulti sono stati sottoposti ad esposizione cutanea di CPF e oxon-CPF e sono stati effettuati esperimenti dose-risposta e di sviluppo nel tempo.

Nelle prime 24 ore dopo l'esposizione sono stati determinati morbilità ed attività di AChE del cervello e del diaframma.

I topi che esprimono PON1-Q192 sono risultati significativamente più sensibili all'oxon-CPF, piuttosto che al CPF, rispetto ai topi che esprimono PON1-R192. La durata dell'inibizione in seguito all'esposizione a 1,2 mg/kg di oxon-CPF ha rivelato l'inibizione massima dell'AChE del cervello a 6-12 h, con PON1-R192, PON1-Q192 e PON1-/- topi che mostrano 40, 70 e 85% di inibizione, rispettivamente, confrontati con i topi di controllo. L'effetto di rimozione di PON1 sulla curva dose-risposta dell'esposizione a CPF, è stata coerente con il modello PBPK/PD di esposizione a CPF. Questi risultati indicano che gli individui che esprimono solo l'allele PON1-Q192 sarebbero più sensibili agli effetti negativi dell'esposizione a CPF e oxon-CPF soprattutto se esprimono un basso livello di PON1-Q192 nel plasma.

In alcuni studi epidemiologici (Rose et al. 2005; Foxenberg et al. 2006) sono stati caratterizzati i profili metabolici di alcuni pesticidi e i rischi associati all'esposizione umana. Tra i pesticidi che sono stati testati, utilizzando microsomi epatici umani, è stato utilizzato anche il CPF.

10. Clorpirifos e Metil-Clorpirifos e biomarcatori

I prodotti di idrolisi degli OP possono essere utilizzati come biomarcatori di esposizione essendo metaboliti che vengono eliminati con le urine. Poiché la

struttura chimica del gruppo uscente è specifica per gli OP, l'individuazione e la quantificazione del gruppo uscente è un biomarcatore di esposizione relativamente specifico del composto originale. Ad esempio, il TCP può essere misurato nelle urine come biomarcatore di esposizione relativamente specifico di CPF e m-CPF.

Valcke et al. (2009) hanno studiato dei valori di riferimento biologici che aiutino ad interpretare i dati relativi ad un biomonitoraggio di esposizione agli OP nei bambini attraverso i valori dei metaboliti alchilfosfato nelle urine.

Per determinare gli effetti non osservati dei livelli biomarcatore-equivalenti per metilfosfati e etilfosfati, rispettivamente sono stati usati modelli che descrivono la cinetica di malathion e CPF negli esseri umani. Questi sono stati espressi sotto forma di quantità totale di alchilfosfato nell'urina su periodi di tempo specifici corrispondenti a un livello di dose assorbita senza effetti osservati e ipotizzando vari possibili scenari di esposizione. Quantità totali di metaboliti metilfosfato e etilfosfato, misurati nelle urine di un gruppo di bambini del Quebec, sono stati poi confrontati con i valori biologici di riferimento proposti.

Da un livello pubblicato di dose di CPF senza effetto osservato, il modello prevede per la somministrazione orale valori di riferimento biologici di metilfosfato e etilfosfato di 106 e 52 nmol/kg di peso corporeo, rispettivamente nella raccolta notturna di 12 ore delle urine, e per assorbimento cutaneo valori di riferimento biologici di 40 e 32 nmol/kg di peso corporeo. Dei 442 campioni di urina a disposizione, solo uno ha presentato una escrezione di metilfosfato superiore al valore biologico di riferimento calcolato sulla base di uno scenario di esposizione cutanea e nessuno dei valori di escrezione di metilfosfato e etilfosfato è stato ottenuto al di sopra dei valori di riferimento biologici da somministrazione orale, che rispecchiano le principali vie di esposizione nei bambini.

Numerosi studi, hanno utilizzato TCP come biomarcatore di esposizione a CPF e m-CPF, con il presupposto che essi sono l'unica fonte di TCP nelle urine e che la maggior parte della dose assorbita viene convertita in TCP ed eliminata nelle urine (Eaton et al. 2008).

Rigas et al. (2001) hanno infatti realizzato uno studio di esposizione agli antiparassitari in Minnesota su un gruppo di 15 bambini (età 3-12) utilizzando il contenuto urinario di TCP come biomarcatore di esposizione al CPF. Sono stati raccolti tre campioni di urina in giorni diversi da ciascuno dei bambini partecipanti esposti al CPF. È stato misurato il volume totale di urina ed i campioni sono stati analizzati per rilevare la presenza di TCP. I dati ottenuti hanno consentito di stabilire la dose totale di CPF ricevuta da ogni singolo bambino.

Pochissimi studi hanno cercato di misurare il CPF nel sangue, e solo uno lo ha utilizzato come biomarcatore di esposizione a causa della sua emivita molto breve. Studi sulla tossicocinetica del CPF nel sangue umano indicano che l'eliminazione plasmatica di elevate dosi di CPF è abbastanza rapida, con un'emivita di poche ore. Inoltre il CPF ha un'elevata solubilità nei lipidi, per cui è probabile che ci sia una certa compartimentazione nel tessuto adiposo che sarebbe in equilibrio con lipidi nel sangue (Eaton et al. 2008).

L'attività delle colinesterasi nel sangue può invece essere considerata come biomarcatore di effetto per gli OP. Individui con sovraesposizione acuta sintomatica agli OP di solito hanno un livello anormalmente basso di attività delle colinesterasi nel siero (butirilcolinesterasi o pseudocolinesterasi) o nei globuli rossi (RBC colinesterasi, più strettamente correlato con l'acetilcolinesterasi del sistema nervoso), ma è variabile nel tempo.

Un biomarcatore di suscettibilità può essere considerato PON1. I polimorfismi del gene PON1 dell'uomo potrebbero rivelarsi importanti biomarcatori di suscettibilità genetica nella valutazione del rischio individuale dovuto agli effetti negativi di un'esposizione eccessiva.

Per il m-CPF è significativa la riduzione dell'attività della colinesterasi ematica, ma anche i livelli urinari e fecali del TCP, suo principale metabolita, misurati mediante cromatografia gas-liquido, potrebbero essere utilizzati come biomarcatori di esposizione (NPIC).

Rauh et al. (2006) hanno effettuato uno studio per determinare l'impatto dell'esposizione prenatale al CPF sullo sviluppo neurologico e comportamentale in un campione di 254 bambini appartenenti alle minoranze di una città nei primi 3 anni di vita, esaminando, in funzione dei livelli di CPF nel plasma del cordone ombelicale, lo sviluppo cognitivo e motorio a 12, 24 e 36 mesi (Bayley Scales of Infant Development II) e comportamentale a 36 mesi (misurata con il Bambino Behavior Checklist).

A 3 anni di età i bambini con livelli elevati di CPF nel plasma del cordone ombelicale hanno ottenuto, in media, valori più bassi dell'Indice di Sviluppo Psicomotorio e dell'Indice di Sviluppo Mentale rispetto a quelli con livelli più bassi di CPF nel plasma del cordone ombelicale. Questi bambini hanno una maggiore probabilità di presentare problemi nello sviluppo psicomotorio e mentale (ritardi, difficoltà di attenzione, disordini e disturbi mentali). Inoltre, la percentuale di bambini in ritardo del gruppo ad elevata esposizione, rispetto al gruppo a bassa esposizione, è risultata 5 volte maggiore per l'Indice di Sviluppo Psicomotorio e 2,4 volte maggiore per l'Indice di Sviluppo Mentale.

Lu et al. 2006 hanno studiato, nei ratti e nell'uomo, la possibilità di utilizzare biomarcatori salivari per misu-

rare l'esposizione ai pesticidi. Il biomarcatore salivare è comodo e non invasivo e le misurazioni delle concentrazioni di pesticidi nella saliva hanno un potenziale di affidabilità che riflette i livelli nel plasma e, quindi, rende una migliore stima dell'esposizione. Questo vantaggio permette di utilizzarli per valutare la dose di pesticida assorbita o il rischio sanitario.

Gli studi di dosaggio sono stati effettuati su ratti maschi Sprague-Dawley per determinare la fattibilità del biomonitoraggio attraverso la saliva per 3 pesticidi diversi tra i quali il CPF. I pesticidi sono stati somministrati per via endovenosa e, subito dopo e fino a 6 ore, sono stati prelevati campioni di saliva e di sangue arterioso. Per validare i risultati ottenuti dagli studi sugli animali, sono stati effettuati 3 diversi studi sull'uomo in Stati Uniti, Nicaragua, e Thailandia durante i quali i biomarcatori salivari sono stati raccolti da un gruppo di individui costituiti da utilizzatori di antiparassitari e dai loro figli.

Dai risultati ottenuti si evince che i biomarcatori salivari non possono essere utilizzati per stimare le concentrazioni di CPF nel plasma, poiché nei ratti non è stato possibile quantificarle già a 35 minuti post-iniezione endovenosa, mentre le concentrazioni plasmatiche potrebbero essere misurate fino a 350 minuti post-somministrazione di CPF.

Campioni di saliva raccolti da utilizzatori di antiparassitari in Nicaragua convalidano con chiarezza i risultati ottenuti sugli animali di laboratorio. In teoria, i biomarcatori salivari possono essere utilizzati per valutare l'esposizione e stimare la dose assorbita per 2 dei pesticidi che sono stati studiati, poiché la farmacocinetica di CPF vieta la sua escrezione nella saliva.

11. Metodi di analisi

Monitoraggio biologico - CPF è stato analizzato in sangue intero, plasma e urina fino a concentrazioni pari a 10 ppb (Drevenkar et al. 1994). L'analogo desolfurato (oxon-CPF) è stato estratto da siero e urina, ma non è stato riportato alcun limite di rilevabilità né la percentuale di recupero (Drevenkar et al. 1993). Il metabolita 3,5,6-tricloro-2-piridinolo (TCP) è stato misurato in sangue intero e urina (Bartels e Kastl 1992, Nolan et al. 1984, Fenske e Elkner 1990, Aprea et al. 1999, Hill et al. 1995).

Alcuni autori hanno misurato anche il dietil fosfato (DEP) in urina e plasma e il dietiltiofosfato (DETP) in plasma con limiti di rilevabilità di circa 50 ppb (Drevenkar et al. 1994, Takamiya 1994).

Il CPF e il suo analogo oxon-CPF possono essere estratti direttamente con solventi organici, mentre TCP, DEP e DETP possono essere isolati dopo idrolisi acida delle forme coniugate. La tecnica utilizzata è prevalen-

temente la gas cromatografia abbinata a vari rivelatori. I metaboliti richiedono la derivatizzazione per poter essere quantificati.

Il TCP urinario è l'indicatore di esposizione più utilizzato. Le tecniche strumentali impiegate per la determinazione di TCP in urina sono principalmente l'HPLC (Chang et al. 1996, Sultatos et al. 1982) e la gas cromatografia. In quest'ultimo caso, si effettua la derivatizzazione con BSA N,O-bis(trimetilsilil)acetamide (BSA), 1-cloro-3-iodopropano o N-(tert-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamide (MTBSTFA), con lo scopo di ottenere composti termostabili e più volatili (Aprea et al. 1997 1999, Fenske et al. 1990, Hill et al. 1995, Bartels et al. 1992).

Le procedure di separazione del TCP dalla matrice sono sempre precedute da una fase di idrolisi acida o enzimatica, in modo da ottenere il composto libero, non coniugato. L'estrazione di TCP dopo idrolisi viene di solito effettuata con toluene, etere dietilico o 1-clorobutano/etere.

Per quanto riguarda le condizioni strumentali, l'analisi con HPLC e rivelazione spettrofotometrica a 300 nm prevede l'impiego di una colonna in fase inversa Chemcosorb ODS (15 cm x 4,6 mm x 5 µm). La fase mobile è costituita da una miscela acetonitrile/acqua contenente l'1% di acido acetico (44:56 v/v), mentre il flusso dell'eluente è di 0,5 ml/min. Il volume iniettato è

di 20 µl e lo standard interno è l'o-nitrofenolo (Chang et al. 1996).

La Tabella 2 riporta in sintesi le condizioni strumentali relative ai principali metodi gas cromatografici.

La procedura in HPLC è stata impiegata per l'analisi di TCP in campioni di urina provenienti da ratti trattati con CPF per via orale. Il metodo di Nolan et al. è stata invece utilizzata per il dosaggio del metabolita in sangue e urina di volontari ai quali era stato somministrato CPF per via orale e dermica.

La procedura di Fenske e Elkner è stata impiegata per il monitoraggio biologico dell'esposizione di operatori che effettuavano trattamenti con CPF durante il controllo strutturale di edifici. In forma modificata, è stata anche usata per dosare il TCP nell'urina di soggetti esposti a CPF-metile durante i trattamenti della vite e il rientro in coltura per operazioni manuali, oltre che in un gruppo di controllo di 46 soggetti non professionalmente esposti al fitofarmaco e in 42 soggetti della popolazione generale italiana.

Il metodo sviluppato da Hill et al. è stato impiegato per il dosaggio di TCP e di altri metaboliti di antiparassitari nell'urina di circa 1000 soggetti della popolazione generale statunitense. Successivamente, lo stesso metodo è stato leggermente modificato e utilizzato nell'ambito dell'indagine NHANES su campioni raccolti tra il 1999 e il 2000 (Barr et al. 2005).

Tabella 2. Principali metodi gascromatografici per la determinazione di TCP urinario. Condizioni strumentali

Rif.	Colonna	Programmata termica	Temp. iniettore	Rivelatore	Temp. rivelatore	Volume iniettato	Tipo iniezione	SI
Nolan et al.	3% OV-1 su Gas Chrom Q 100-120 mesh	isoterma a 145°C	220°C	ECD	350°C	4 ml	n.d.	-
Fenske e Elkner	RLS-200 15 m 0,32 µm	120°C (1 min); 50°C/min a 220°C	150°C	ECD	300°C	1 ml	splitless	eptacloroepossido
Aprea et al.	Chrompack CP-Sil 5, 25 m x 0,32 mm x 0,4 mm	90°C (1 min), 5°C/min, 200 (5 min), 30°C/min a 250°C	225°C	ECD	250°C	1 ml	splitless	γ-esaclorocicloesano
Hill et al.	J&W Scientific DB-5 30 m x 0,25 µm x 0,25 mm	80°C (2 min), 10°C/min, 160°C, 4°C/min a 260°C	n.d.	MS/MS in Cl positiva (gas CH4)	n.d.	n.d.	n.d.	diluizione isotopica con ¹³ C TCP
Bartels e Kastl	J&W Scientific DB-5 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm	175°C (5 min); 25°C/min a 275°C	280°C	MS/MS in Cl negativa (gas CH4)	interfaccia 280°C	n.d.	splitless	3,4,5-tricloropiridinolo
Aprea et al.	HP-PONA 50 m x 0,32 mm 0,5 µm	90°C (1 min), 5°C/min, 200 (5 min), 30°C/min a 250°C (15 min)	225°C	MS (SIM m/z 254 e 256 per TCP e m/z 181 e 183 per SI)	interfaccia 250°C	1 µl	splitless	γ-esaclorocicloesano

Monitoraggio ambientale - I metodi analitici ufficiali per il campionamento in aria e la determinazione degli insetticidi organofosforici, tra cui il CPF, sono il NIOSH 5600 e l'OSHA 62.

Il metodo NIOSH 5600 prevede l'utilizzo di un dispositivo per il campionamento, denominato OVS 2, costituito da una fiala di vetro contenente un substrato adsorbente, XAD-2, di 20-60 mesh. Quest'ultimo è suddiviso in due sezioni di 270 e 140 mg, separate da schiuma poliuretana. La sezione frontale è tenuta in loco da un filtro in fibra di quarzo supportato da un anello di politetrafluoroetilene (PTFE). Il metodo OSHA 62 riporta un dispositivo del tutto analogo, con la differenza che il filtro in fibra di quarzo è sostituito da un filtro in fibra di vetro.

Il metodo EPA TO10 consiglia l'utilizzo di un dispositivo costituito da una fiala in vetro borosilicato di 10 cm di lunghezza e 20 mm di diametro che si restringe a 7 mm per l'attacco al campionatore, contenente una cartuccia adsorbente in schiuma poliuretana (PUF).

Secondo il metodo NIOSH 5600, dopo il campionamento, il filtro in fibra di quarzo e la parte frontale dell'adsorbente vengono trasferiti in un contenitore, mentre la schiuma poliuretana e la sezione posteriore sono posti in un secondo contenitore. L'estrazione dell'analita dalla matrice viene effettuata con una miscela toluene/acetone (90:10). Dopo 30 min di contatto, i contenitori vengono immersi per 30 min in un bagno a ultrasuoni o alternativamente in agitatore per 1 h. I campioni sono quindi sottoposti ad analisi in gascromatografia. Nel metodo OSHA 62, la procedura adottata per la preparazione del campione è del tutto simile, ma il solvente di deadsorbimento è toluene e il campione viene mantenuto a contatto con il solvente per 1 h.

Il metodo EPA TO10 prevede l'estrazione della cartuccia adsorbente in Soxhlet con una miscela al 5% di etere in esano. Al termine dell'estrazione il solvente viene concentrato e sottoposto a purificazione su allumina, eluendo con esano. Alternativamente, la purificazione può essere effettuata su cartucce Florisil.

Per quanto riguarda le tecniche strumentali, il metodo NIOSH 5600 e il metodo OSHA 62 prevedono l'impiego della gascromatografia con colonna capillare e rivelazione a fotometria di fiamma (FPD). Il metodo EPA TO10 utilizza la gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni (ECD).

Il limite di questi metodi è che non sono stati validati per tutti gli analiti per cui sono stati sviluppati. Per il CPF non sono sempre forniti i parametri che definiscono l'affidabilità del metodo. Inoltre, questi metodi si mostrano validi per il dosaggio di insetticidi organofosforici in aria in condizioni di esposizione professionale. La sensibilità di tali metodi non consente infatti la determinazione di livelli aerodispersi in presenza di modesta contaminazione. Per quanto riguarda la specificità, l'impiego della spettrome-

tria di massa consente di confermare la presenza dell'analita in caso di sospette interferenze analitiche.

12. Valori di riferimento del CPF

I valori di TCP urinario riflettono l'esposizione recente.

I livelli di TCP in sottogruppi della popolazione generale statunitense (NHANES 1999-2000 e 2000-2001) si sono rivelati simili a quelli riportati per un campione monitorato nell'ambito del NHANES III (Hill et al. 1995) e sono risultati allineati anche con quelli riscontrati nella popolazione tedesca (Koch et al. 2001) e italiana (Aprea et al. 1999).

In 6990 campioni di urina di soggetti che partecipavano in USA alla National Health and Nutrition Examination Survey II (NHANES II), il TCP è stato determinato nel 5,8% dei campioni analizzati con un limite di rivelabilità di 5 µg/l; il massimo valore osservato era di 104 µg/l; i campioni di urina sono stati raccolti tra il 1976 e il 1980 (Kutz et al. 1992).

In un successivo studio (Hill et al. 1995), effettuato nell'ambito del NHANES III su circa 1000 campioni di urina prelevati tra il 1988 e il 1994, la percentuale di positività è risultata dell'82%, con un limite di rilevabilità di 1,0 µg/l, valori medi pari a 3,1 µg/g creat. e valori massimi di 34,0 µg/g creat.

I risultati ottenuti in uno studio condotto su 42 soggetti della popolazione generale italiana concordano con quelli del NHANES III. L'88% dei dati mostra concentrazioni di metabolita superiori al limite di rivelabilità di 1,2 µg/l con una media geometrica pari a 2,8 µg/g creat.

Le indagini più recenti, realizzate tra il 1999 e il 2000 (n = 1994) e tra il 2001 e il 2002 (n = 2509), hanno evidenziato valori molto simili tra loro, oltre che una tendenza alla diminuzione dei livelli di TCP nella popolazione generale americana, con media geometrica pari rispettivamente a 1,58 e 1,73 µg/g creat (CDC 2005).

La valutazione dei livelli urinari di TCP fornisce a medici e ricercatori valori di riferimento per stimare l'entità dell'esposizione e studiare possibili correlazioni con l'insorgenza di effetti avversi per la salute.

13. Esposizione attraverso la dieta e Concentrazioni di Riferimento dell'intake alimentare

La popolazione generale è esposta a CPF principalmente per inalazione (indoor) e ingestione di cibi contenenti CPF, o attraverso il contatto cutaneo durante o dopo l'applicazione di pesticida. Tuttavia, CPF è raramente rilevato in aria, e comunque solo in concentrazioni molto basse. Non ci si attende che la via principale

6. Clorpirifos e clorpirifos-metile

INTERFERENTI ENDOCRINI ■ SCHEDE MONOGRAFICHE

di esposizione della popolazione generale sia l'inalazione, quanto piuttosto il consumo di acqua e soprattutto di cibi contaminati. Anche la contaminazione per contatto cutaneo è considerata trascurabile per la popolazione generale.

La contaminazione accidentale può essere causata dall'uso di alimenti che contengono residui di pesticidi organofosforici a causa di trattamenti fitosanitari non adeguati e del mancato rispetto dei tempi di decadimento dei principi attivi. La *Food and Drug Administration* (FDA) ha stabilito limiti di tolleranza per la presenza di CPF nei prodotti agricoli che vanno da 0,05 a 15 ppm (CODEN CSMHAF 2005).

Rastrelli et al. (2002) hanno svolto uno studio per verificare la presenza di residui di 18 pesticidi organofosforici in campioni di olio di oliva extra vergine prodotti nel Cilento (Campania, Italia) mediante gascromatografia capillare con rivelatore azoto/fosforo (NPD) dopo estrazione del campione con n-esano e purificazione con un sistema single-step multi-cartuccia.

Sessantacinque campioni di olio sono stati prelevati dalle zone di produzione più importanti nel periodo 1999-2000. In 31 campioni sono stati trovati nove pesticidi organofosforici (azinfos etile, m-CPF, diazinone, dimetoato, fention, formotion, metidation, parathion e parathion metile) in concentrazioni che vanno 0,030-0,120 mg/kg, mentre non sono stati individuati gli altri nove (acefate, carbophenothion, CPF, malaoxon, malathion, metamidofos, ometoato, paraoxon-metile, e pirimifosmetile). Le quantità recuperate dei 18 pesticidi, a tre livelli di concentrazione (0,5, 1,0 e 2,5 mg/kg) erano comprese tra 82-110%. Solo due campioni contenevano residui di dimetoato che hanno superato il limite massimo dei residui (LMR) stabiliti dalla FAO/OMS Codex Alimentarius.

Il m-CPF, presenta una bassa persistenza, è relativamente stabile e alcuni studi hanno evidenziato la sua azione prolungata contro gli insetti che attaccano la granella ed i prodotti immagazzinati. La presenza di m-CPF nel frumento permette una conservazione nei magazzini che è in media di 3-5 mesi. I residui di CPF generalmente sono presenti negli strati esterni dei chicchi di grano (crusca), ma diminuiscono nella farina e si riducono ancora di più nel pane.

Nel 2007 l'*U.S. Department of Agriculture* (USDA) ha raccolto dei dati sui residui di CPF negli alimenti. Su 9734 campioni di verdura e di frutta sono stati trovati residui di CPF in 339 prodotti (18,0% delle pesche, 15,8% delle nettarine, 6,8% dei broccoli, 5,2% dei cavoli, 46% delle mandorle e nel 30% dei campioni di grano).

Livelli superiori ai limiti di tolleranza di CPF sono stati rilevati dall'EPA in campioni di cavolo riccio (6,3 ppm a tolleranza di 2,0 ppm) e zucca (0,33 ppm a tolleranza di 0,10 ppm) provenienti dagli Stati Uniti (USDA 2008).

Poiché l'utilizzo di pesticidi viene effettuato con sempre maggiore attenzione sia per la salvaguardia dei consumatori, sia per l'ambiente, ogni anno in Italia, come in tutti i paesi dell'Unione Europea, viene svolto il monitoraggio dei residui di pesticidi sui prodotti alimentari.

In Italia nel 2008, nonostante una diminuzione dei campioni analizzati (quasi 1300 in meno rispetto all'anno precedente), è stato riscontrato comunque un lieve incremento di campioni irregolari con concentrazioni troppo elevate di residui di agrofarmaci rispetto ai limiti stabili dalla legge.

La frutta è la categoria più inquinata e solo un frutto su due (53,8%) è privo di residui chimici.

È stata riscontrata la contaminazione da CPF nell'uva, nelle mele, nelle pere, nelle pesche noci e nelle fragole, ma anche negli ortaggi (peperoni, pomodori, sedano, finocchi e bietole da costa).

Nel 2002 residui di m-CPF sono stati ritrovati in circa il 3,5% di tutti i campioni di frutta analizzati. Sono stati effettuati studi sulle "cere epicuticolari", molecole apolari presenti sulla superficie di foglie e frutta, che costituiscono una importante barriera alla penetrazione dei pesticidi, sono in grado di influenzarne la velocità di fotodegradazione e quindi la sua persistenza. Le cere epicuticolari influenzano il processo di fotodegradazione del m-CPF (probabilmente degradato in TCP), rallentando le cinetiche fotodegradative. È presumibile che le cere, assorbendo le radiazioni, proteggano i pesticidi dalla fotodegradazione i quali, formando legami chimici con i componenti delle cere, siano meno accessibili alle radiazioni (Cabras et al. 1997; Angioni et al. 2004; Ministero della Salute 2002; Mc Donald et al. 1993). I residui del pesticida applicato sulle foglie dei pompelmi e delle arance e la loro dispersione sulla cuticola sono stati misurati usando la gascromatografia, evidenziando che i residui sulle cuticole si degradano rapidamente in 2,8 giorni nelle arance e 3,7-6,7 giorni nel pompelmo, mentre non sono stati trovati residui al di sopra di 0,03 ppm nella polpa degli agrumi trattati (Iwata et al. 1983).

Curl et al. nel 2003 hanno valutato l'esposizione agli antiparassitari organofosforici attraverso la dieta mediante monitoraggio biologico di bambini in età prescolare tra Seattle e Washington. Inoltre per ogni casa è stato registrato l'uso residenziale dei pesticidi. Sono stati raccolti campioni di urina di 24 ore da 18 bambini con dieta biologica e 21 bambini con dieta convenzionale che sono stati analizzati per cinque metaboliti dei pesticidi OP. Le concentrazioni medie totali significativamente più elevate sono state riscontrate per il dime-tilalchilfosfato e l'etilalchilfosfato (0,06 e 0,02 mmol/l, rispettivamente, $p = 0,0001$).

La concentrazione media totale del metabolita dime-tile era di circa sei volte superiore per i bambini con

dieta convenzionale rispetto ai bambini con dieta biologica (0,17 e 0,03 mmol/l; $p = 0,0003$).

Lu Chensheng et al. nel 2006 hanno valutato l'esposizione dietetica ai pesticidi organofosforici in un gruppo di 23 bambini in età scolare elementare attraverso il biomonitoraggio urinario. Nella maggior parte dei bambini la dieta convenzionale è stata sostituita con prodotti alimentari biologici per 5 giorni consecutivi e sono stati raccolti due campioni al giorno di urina per 15 giorni. È stato rilevato che le concentrazioni urinarie medie dei metaboliti specifici per malathion e CPF scendevano a livelli non rilevabili subito dopo l'introduzione della dieta biologica e rimanevano tali fino alla reintroduzione delle diete tradizionali. Le concentrazioni medie dei metaboliti degli altri pesticidi organofosforici sono state anche più basse durante il consumo della dieta biologica e l'individuazione di tali metaboliti non è stata sufficiente per fornire dati statistici significativi.

Entrambi questi studi suggeriscono che il consumo di frutta, ortaggi, e succhi biologici possano ridurre i livelli di esposizione dei bambini in accordo con le attuali linee guida della US *Environmental Protection Agency* in modo da spostare l'esposizione da una condizione di rischio incerto a quella di rischio trascurabile. Sembra inoltre che la dieta biologica possa fornire un immediato effetto protettivo contro gli effetti dovuti a tale esposizione.

La FAO/WHO (Organizzazione per il cibo e l'agricoltura in collaborazione con l'Organizzazione Mondiale della Sanità) ha stabilito un ADI (*Acceptable Daily Intake*) per CPF e CPF-metile pari a 10 µg/kg peso corporeo.

14. Esposizione professionale a CPF

I lavoratori coinvolti nella produzione, formulazione, o applicazione di CPF, o i soggetti addetti allo smaltimento dei rifiuti contaminati da CPF possono essere esposti a concentrazioni elevate di questo pesticida per contatto dermico e inalazione. Anche persone che lavorano a contatto con piante che hanno subito trattamenti con composti contenenti CPF possono essere esposte per assorbimento attraverso il sistema respiratorio e la pelle (Aprea et al. 1994). Uno studio effettuato nel 1987 su addetti al controllo delle pulci in California ha evidenziato un'associazione tra l'esposizione a CPF ed effetti avversi per la salute, tra cui visione offuscata, cute arrossata, e diminuzione dell'emissione dell'urina (Ames et al. 1989). In un'indagine condotta in uffici dopo l'applicazione di CPF, sono state misurate concentrazioni di CPF aerodisperso fino a 27 µg/m³ a 4 h di distanza dall'applicazione. I livelli di CPF in aria sono risultati inferiori nei locali arredati rispetto a quelli non arredati. Sulle superfici è stata verificata una contaminazione residua fino a 5,9 ng/cm² 48 h dopo l'applicazione (Currie et al. 1990).

Hodgson et al. (1986) hanno riportato sintomi riconducibili a intossicazione da organofosfati tra 5 soggetti esposti a termiticida dopo trattamento effettuato nei loro uffici.

La valutazione dell'esposizione professionale è stata effettuata da alcuni autori misurando l'escrezione urinaria di TCP e confrontando i valori con quelli ottenuti per la popolazione generale. Ad esempio, Burns et al. (2006) hanno monitorato 52 soggetti coinvolti nella produzione di CPF e la concentrazione media negli esposti è risultata variabile tra 22 µg/l e 325 µg/l, in funzione della mansione svolta e della conseguente potenziale entità dell'esposizione. La concentrazione urinaria media di TCP nel gruppo di controllo è risultata pari a 7 µg/l, allineata con quella della popolazione generale (Hill et al. 1995; Mandel et al. 2005).

Tuttavia, i dati disponibili sono disomogenei e numericamente poco significativi per consentire di stabilire una correlazione tra l'esposizione a CPF e l'insorgenza di effetti avversi per la salute, soprattutto perché raramente è stata valutata l'esposizione al solo clorpirifos. Nella maggior parte degli studi è stata infatti monitorata l'esposizione a miscele di insetticidi organofosfati.

15. Legislazione

L'autorizzazione e l'immissione in commercio degli agrofarmaci era regolata dalla Direttiva 91/414/CE che uniformava le procedure di registrazione dei prodotti fitosanitari, definendo procedure e criteri per la valutazione dei possibili rischi per l'uomo (operatori e consumatori), gli animali e l'ambiente. Successivamente con la Direttiva 2005/72/CE del 21 ottobre 2005, che modificava la Direttiva 91/414/CE, si è stabilito un elenco di sostanze attive valutate in vista di un loro possibile inserimento nell'Allegato I della Direttiva 91/414/CE. Tale lista comprendeva le sostanze CPF e m-CPF, che sono rientrate nei severissimi parametri tossicologici e ambientali europei concludendo positivamente la revisione comunitaria. Le criticità riscontrate per CPF e m-CPF riguardano la protezione degli uccelli, dei mammiferi, degli organismi acquatici, delle api e degli artropodi non bersaglio e sono stati richiesti studi complementari su uccelli e mammiferi.

Attualmente la nuova Direttiva 2009/128/CE sull'uso sostenibile degli agrofarmaci regolamenta, per la prima volta a livello europeo, l'utilizzo di tali prodotti sostenendo l'uso della difesa integrata e di tecniche alternative di coltivazione per ridurre i rischi e l'impatto sulla salute umana e sull'ambiente e intraprendendo la strada per lo sviluppo di un'agricoltura ecocompatibile.

L'obiettivo è ridurre i livelli di sostanze attive nocive, sostituendo quelle più pericolose con sostanze alternative (anche non chimiche) più sicure e favorendo

6. Clorpirifos e clorpirifos-metile

un'agricoltura che usi quantità limitate di pesticidi o che li abolisca (dal 2014 gli utilizzatori di prodotti fitosanitari dovranno adottare i principi della difesa integrata delle colture). Gli Stati Membri dovranno far entrare in vigore le disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative necessarie per conformarsi alla Direttiva entro 2 anni dalla sua entrata in vigore (giugno 2011).

Possono essere bandite le sostanze etichettate come tossiche o addirittura cancerogene, persistenti e molto persistenti o che bioaccumulano nell'ambiente e tutte quelle sostanze che potrebbero avere degli effetti negativi sulla salute degli esseri umani, come gli interferenti endocrini o quelle che hanno effetti neurotossici. È fatto salvo che, in particolari condizioni di emergenza non gestibili con tecniche alternative, tali sostanze potranno essere provvisoriamente utilizzate, per un periodo non superiore ai 5 anni.

Tenendo conto della salute umana e dell'ambiente, ogni Stato membro, entro 5 anni dall'entrata in vigore di questo provvedimento, dovrà redigere dei piani d'azione nazionale indicando gli obiettivi, le misure e i tempi necessari per ridurre i rischi derivanti dai pesticidi e introducendo all'interno del proprio territorio metodi di produzione alternativi che, come l'agricoltura biologica o la lotta integrata, riducano la dipendenza dalla chimica di sintesi.

I paesi membri, inoltre, dovranno ridurre o vietare l'impiego di pesticidi in aree sensibili, come aree protette, giardini pubblici, zone ricreative nei pressi di scuole o strutture sanitarie, come pure negli ambienti acquatici o presso le fonti di approvvigionamento di acqua per l'uso umano.

Bibliografia

- Abell A, Ernst E, Bonde JP. Semen quality and sexual hormones in greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health* 2000; 26: 492-500.
- Abell A, Juul S, Bonde JP. Time to pregnancy among female greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health* 2000; 26: 131-6.
- Abend Y, Goland S, Evron E, Sthoeger ZM, Geltner D. Acute renal failure complicating organophosphate intoxication. *Re Fail* 1994; 16(3): 415-417.
- Abou-Donia MB, Graham DG. Delayed neurotoxicity from long-term low level administration of leptophos to the comb of hens. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978; 46: 199-213.
- Alavanja MCR, Samanic C, Dosemeci M, Lubin J, Tarone R, Lynch CF, Knott C, Thomas K, Hoppin JA, Barker J, Coble J, Sandler DP, Blair A. Cancer: possible association with increase risk of prostate cancer. Use of Agricultural Pesticides and Prostate Cancer Risk in the Agricultural Health Study Cohort. *Am J of Epidem* 2003; 157: 800-814.
- Ali D, Nagpure NS, Kumar S, Kumar R, Kushwaha B. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis 2008 May; 71(10): 1823-31. *Epub* 2008 Mar 24.
- Ames RG, Brown SK, Rosenberg J, et al. Health symptoms and occupational exposure to flea control products among California pet handlers. *Am Ind Hyg Assoc J* 1989; 50(9): 466-472.
- Angioni A, Cabizza M, Cabras M, Melis M, Tuberoso C, Cabras P. Effect of the epicuticular waxes of fruits and vegetables on the photodegradation of rotenone. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 3451-3455.
- Antonucci GA, de Syllos Colus IM. Chromosomal aberrations analysis in a Brazilian population exposed to pesticides. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 2000; 20: 265-72.
- Aprea C, Betta A, Catenacci G, Lotti A, Magnaghi S, Barisano A, Passini V, Pavan I, Sciarra G, Vitalone V, Minoia C. Reference values of urinary 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in the Italian population—validation of analytical method and preliminary results (multicentric study). *J AOAC Int* 1999 Mar-Apr; 82(2): 305-12.
- Aprea C, Sciarra G, Sartorelli P, Sartorelli E, Strambi F, Farina GA, Fattorini A. Biological monitoring of exposure to chlorpyrifos-methyl by assay of urinary alkylphosphates and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol. *J Toxicol Environ Health* 1997 Apr 25; 50(6): 581-94.
- Arbuckle TE, Lin Z, Mery LS. An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 851-7.
- Arbuckle TE, Savitz DA, Mery LS, Curtis KM. Exposure to phenoxy herbicides and the risk of spontaneous abortion. *Epidemiology* 1999; 10: 752-60.
- Au WW, Sierra-Torres CH, Cajas-Salazar N, Shipp BK, Legator MS. Cytogenetic effects from exposure to mixed pesticides and the influence from genetic susceptibility. *Environ Health Perspect* 1999; 107: 501-55.
- Barker D, Eriksson JG, Forsen T, Osmond D. Fetal origins of adult disease: strength of effect and biological basis. *Int J Epidemiol* 2002; 31: 1235-9.
- Barr DB, Allen R, Olsson AO, Bravo R, Caltabiano LM, Montesano A, Nguyen J, Udunka S, Walden D, Walker RD, Weerasekera G, Whitehead RD Jr, Schober SE, Needham LL. Concentrations of selective metabolites of organophosphorus pesticides in the United States population. *Environ Res* 2005 Nov; 99(3): 314-26.
- Bartels M.J, Kastl PE. Analysis of 3,5,6-trichloropyridinol in human urine using negative-ion chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr* 1992; 575: 69-74.
- Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. *Biomedical Publications, Davis, California*, 1795, pp. 1982.
- Beane Freeman LE, Bonner MR, Blair A, Hoppin JA, Sandler DP, Lubin JH, Dosemeci M, Lynch CF, Knott C, Alavanja MC. Cancer incidence among male pesticide applicators in the Agricultural Health Study cohort exposed to diazinon. *Am J Epidemiol* 2005 Dec 1; 162(11): 1070-9.
- Bell EM, Hertz-Picciotto I, Beaumont JJ. Case-cohort analysis of agricultural pesticide applications near maternal residence and selected causes of fetal death. *Am J Epidemiol* 2001; 154: 702-10.
- Benke GM, Murphy SD. The influence of age on the toxicity and metabolism of methyl parathion and parathion in male and female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 31: 254-269.
- Besser R, Gutman L, Dillman U, Weilemann LS, Hopf HC. End-plate dysfunction in acute organophosphate intoxication. *Neurology* 1989; 39: 561-567.
- Blair D, Hoadley EC, Hutson DH. The distribution of dichlorvos in the tissues of mammals after its inhalation or intravenous administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975; 31: 243-353.
- Bolognesi C, Morasso G. Genotoxicity of pesticides: potential risk for consumers *Trends in Food Science & Technology* 2000; 11: 182-187.
- Bonner MR, Coble J, Blair A, Beane Freeman LE, Hoppin JA, Sandler DP, Alavanja MC. Malathion exposure and the incidence of cancer in the agricultural health study. *Am J Epidemiol* 2007; Nov 1; 166(9): 1023-34.

- Bright JE, Inns RH, Tuckwell NJ, Griffiths GD, Marrs TC. A histochemical study of changes observed in the mouse diaphragm after organophosphate poisoning. *Hum Exp Toxicol* 1991; 10: 9-14.
- Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 77-84.
- Burns CJ, Garabrant D, Albers JW, Berent S, Giordani B, Haidar S, et al. Chlorpyrifos exposure and biological monitoring among manufacturing workers. *Occup Environ Med* 2006; 63(3): 218-220.
- Cabras P, Angioni A, Garau VL, Melis M, Pirisi FM, Minelli EV. Effect of the epicuticular waxes of fruits on the photodegradation of fenthion. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 3681-3683.
- Carbonell E, Valbuena A, Xamena N, Creus A, Marcos R. Temporary variations in chromosomal aberrations in a group of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutation Res* 1995; 344: 127-34.
- Carbonell E, Xamena N, Creus A, Marcos R. Cytogenetic biomonitoring in a Spanish group of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis* 1993; 8: 511-7.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta (GA). 2005.
- Chang MJ, CY Lin, LW Lo, RS Lin. Biological monitoring of exposure to chlorpyrifos by high performance liquid chromatography. *Bull Environ Contam Toxicol* 1996; 56: 367-374.
- Cile TB, Walter BJ, Shih DM, Tward AD, Lusia AJ, Timchalk C, Richter RJ, Costa LG, Furlong CE. Toxicity of chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon in a transgenic mouse model of the human paraoxonase (PON1) Q192R polymorphism. *Pharmacogenetics and genomics* ISSN 1744-6872 2005, vol. 15, n° 8, pp. 589-598.
- Cole TB, Walter BJ, Shih DM, Tward AD, Lusia AJ, Timchalk C, Richter RJ, Costa LG, Furlong CE. Toxicity of chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon in a transgenic mouse model of the human paraoxonase (PON1) Q192R polymorphism. *Pharmacogenetics and Genomics* 2005; 15: 589-598.
- Costa C, Catania S, Silvani V. Genotossicità ed attivazione di antiparassitari organofosforici e carbammati da parte del citocromo P450 2D6. Comunicazioni valutazione del rischio in tossicologia occupazionale. *G Ital Med Lav Erg* 2003; 25: 3 Suppl, 35-115.
- Costa Lucid G, Richter Rebecca J, Li Wan-Fen. Paraoxonase (PON1) as a biomarker of susceptibility for organophosphate toxicity. *Biomarkers (London, Print)* A. 2003, vol. 8, n° 1, pp. 1-12.
- Crisostomo L, Molina VV. Pregnancy outcomes among farming households of Nueva Ecija with conventional pesticide use versus integrated pest management. *Int J Occup Environ Health* 2002; 8: 232-42.
- Curl CL, Fenske RA, Elgethun K. Organophosphorus Pesticide Exposure of Urban and Suburban Preschool Children with Organic and Conventional Diets. *Environmental Health Perspectives*, Volume 111, Number, March 2003.
- Currie KL, McDonald EC, Chung LTK, et al. Concentrations of diazinon, chlorpyrifos, and bendiocarb after application in offices. *Am Ind Hyg Assoc J* 1990; 51(1): 23-27.
- Curtis KM, Savitz DA, Weinberg CR, Arbuckle TE. The effect of pesticide exposure on time to pregnancy. *Epidemiology* 1999; 10: 112-7.
- Dabrowski S, Hanke W, Polanska K, Makowiec-Dabrowska T, Sobala W. Pesticide exposure and birthweight: an epidemiological study in Central Poland. *Int J Occup Environ Health* 2003; 16: 31-9.
- Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE. The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996; 14: 334-336.
- De Angelis S, Tassinari R, Maranghi F, Eusepi A, Di Virgilio A, Chiarotti F, Ricceri L, Venerosi Pesciolini A, Gilardi E, Moracci G, Calamandrei G, Olivieri A, Mantovani A. Developmental exposure to chlorpyrifos induces alterations in thyroid and thyroid hormone levels without other toxicity signs in cd1 mice. *Toxicol Sci* 2009; 108(2): 311-9.
- De Bleeker J, Van den Neucker K, Colardyn F. Intermediate syndrome in organophosphate poisoning: a prospective study. *Crit Care Med* 1993; 21: 1706-1711.
- De Cock J, Westveer K, Heederik D, te Velde E, Van Kooij R. Time to pregnancy and occupational exposure to pesticides in fruit growers in The Netherlands. *Occup Environ Med* 1994; 51: 693-9.
- Deakin S, Leviev I, Brulhart-Meynet M-C, James RW. Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role for polymorphic position -107, implicating the Sp1 transcription factor. *Biochem J* 2003; 372: 643-649.12639220.
- Deaking SP, James RWJ. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clinical Science* 2004; 107, 435-447.
- Dettbarn WD. Pesticide-induced muscle necrosis: mechanism and prevention. *Fund Appl Toxicol* 1984; 4: 18-26.
- Dimich-Ward H, Hertzman C, Teschke K, Hershler R, Marion SA, Ostry A, et al. Reproductive effects of paternal exposure to chlorophenylate wood preservatives in the sawmill industry. *Scand J Work Environ Health* 1996; 22(4): 267 - Erratum in: *Scand J Work Environ Health* 1998; 24(5): 416.
- Direttiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 21 ottobre 2009 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* del 24.11.2009, L 309/71.
- Direttiva 2005/72/CE della Commissione, del 21 ottobre 2005, che modifica la Direttiva 91/414/CEE del Consiglio al fine di includere le sostanze attive clorpirifos, clorpirifos metile, mancozeb, maneb e metiram (Testo rilevante ai fini del SEE). *Gazzetta ufficiale n. L 279 del 22/10/2005 pag. 0063-0069.*
- Direttiva 91/414/CEE del Consiglio, del 15 luglio 1991, relativa all'importazione in commercio dei prodotti fitosanitari. *Gazzetta ufficiale n. L 230 del 19/08/1991 pag. 0001-0032 edizione speciale finlandese: capitolo 13 tomo 20 pag. 0236 edizione speciale svedese/ capitolo 13 tomo 20 pag. 0236*
- Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Enzymatic characterization of recombinant human paraoxonases (PON1, PON2 AND PON3)-lactonases with overlapping and distinct substrate specificities; Downloaded from www.jlr.org by on July 3, 2010.
- Dreisbach RH, Robertson WO. *Handbook of poisoning: diagnosis and treatment*. Appleton & Lange, Connecticut, 589, pp. 1987.
- Drevenkar V, Fink K, Stipcevic M, Tokalcevic B. The fate of pesticides in aquatic environment II. Hydrolysis of dichlorvos in model system and in river water. *Arch Hig Rada* 1976; 27: 297-305.
- Drevenkar V, Stengl B, Froebe Z. Microanalysis of dialkylphosphorus metabolites of organophosphorus pesticides in human blood by capillary gas chromatography and by phosphorus-selective and ion trap detection. *Anal Chim Acta* 1994; 290(3): 277-286.
- Drevenkar V, Vasilic Z, Stengl B, et al. Chlorpyrifos metabolites in serum and urine of poisoned persons. *Chem Biol Interact* 1993; 87(1-3): 315-322.
- Eaton DL, Daroff RB, Bridges J, Buffler P, Costa LG, Coyle J, McKhann G, Mobley WC, Nadel L, Neuber D, Schulte-Hermann R, Spencer PS, Review of the Toxicology of Chlorpyrifos With an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment, *Critical Reviews in Toxicology* 2008; S2: 1-125.
- Ecobichon DJ. Toxic effects of pesticides. In: Klaasen CD. (ed). *Casarett & Doull's Toxicology (1996). The basic science of poisons*. McGraw-Hill, New York.
- Ecobichon DJ, Ozere RL, Reid E, Crocker JFS. Acute fenitrothion poisoning. *Ca Med Assoc J* 1977; 116: 377-379.
- Eddleston M. Patterns and problems of deliberate self-poisoning in the developing world. *Q J Med* 2000; 93: 715-31.
- Edson EF. No-effect levels of three organophosphates in rat, pig and man. *Food Cosmet Toxic* 1964; 2: 311-316.

6. Clorpirifos e clorpirifos-metile

INTERFERENTI ENDOCRINI ■ SCHEDE MONOGRAFICHE

- Ellenhorn MJ, Schonwald S, Ordog G, Wassberger J. *Ellenhorn's Medical Toxicology. Diagnosis and treatment of human poisoning*. 2nd edition. Williams & Williamson, Baltimore, USA. 1997.
- Engel LS, O'Meara ES, Schwartz SM. Maternal occupation in agriculture and risk of limb defects in Washington State, 1980-1993. *Scand J Work Environ Health* 2000; 26: 193-8.
- Fang H, Yu YL, Wang XG, Chu XQ, Pan XD, Yang XE. Effects of Repeated Applications of Chlorpyrifos on its Persistence and Soil Microbial Functional Diversity and Development of its Degradation Capability, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Volume 81, Number 4/October, 2008.
- Fenske RA, Elkner KP. Multi-route exposure assessment and biological monitoring of urban pesticide applicators during structural control treatments with chlorpyrifos, *Toxicol Ind Health* 1990; 6: 349-371.
- Fenske RA, Lu C, Curl CL, Shirai JH, Kissel JC. Biologic Monitoring to Characterize Organophosphorus Pesticide Exposure among Children and Workers: An Analysis of Recent Studies in Washington State *Environmental Health Perspectives*, Volume 113, Number 11, November 2005.
- Foxemberg et al. Human Hepatic Cytochrome P450-Specific Metabolism of Parathion and Chlorpyrifos Received August 9, 2006; accepted October 25, 2006.
- Furlong CE et al. Considerations for Exposure to Diazinon and Chlorpyrifos 2004, PhD Research Professor Departments of Medicine (Div. Medical Genetics), and Genome Sciences University of Washington, Seattle, WA 98195-7720 clem@u.washington.edu
- Gadoth N, Fisher A. Late onset of neuromuscular block in organophosphorus poisoning. *Ann Int Med* 1978; 88(5): 654-655.
- Gallo MA, Lawryk NJ. Chapter 16. Organic Phosphorus Pesticides. 1991: 917-1123. In: Hayes WJ & Laws (eds) *Pesticides studied in man*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Garaj-Vrhovac V, Zeljezic D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. *J Appl Toxicol* 2002; 22: 249-55.
- Garcia AM, Benavides FG, Fletcher T, Orts E. Paternal exposure to pesticides and congenital malformations. *Scand J Work Environ Health* 1998; 24: 473-80.
- Garcia AM, Fletcher T, Benavides F, Orts E. Parental agricultural work and selected congenital malformations. *Am J Epidemiol* 1999; 149: 64-74.
- Garcia-Rodríguez J, Garcia-Martin M, Noguera-Ocana M, de Dios Lunadel-Castillo J, Espigares-Garcia M, Olea N, et al. Exposure to pesticides and cryptorchidism: geographical evidence of a possible association. *Environ Health Perspect* 1996; 104: 1090-5.
- Garry VF, Harkins ME, Erickson LL, Long-Simpson LK, Holland SE, Burroughs BL. Birth defects, season of conception, and sex of children born to pesticide applicators living in the Red River Valley of Minnesota, USA. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 441-9.
- Garry VF, Harkins ME, Lyubimov A, Erickson LL, Long L. Reproductive outcomes in the women of the Red River Valley of the North. I. The spouses of pesticide applicators: pregnancy loss, age at menarche, and exposure to pesticides. *J Toxicol Environ Health A* 2002; 65: 769-86.
- Geldmacher V. Mallinckrodt e Diepgen. *Toxicol Environ Chem* 1988; 18: 79-196
- Gerhard I, Daniel V, Link S, Monga B, Runnebaum B. Chlorinated hydrocarbons in women with repeated miscarriages. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 675-81.
- Gerhard I, Frick A, Monga B, Runnebaum B. Pentachlorophenol exposure in women with gynecological and endocrine dysfunction. *Environ Res* 1999; 80: 383-8.
- González-Horta MDC, Rojas-García AE, Carballo-Carballo F, Torres-Zalba R, Sánchez-Ramírez BE, Erosa de la Vega G, Arévalo-Gallegos S, Quintanilla-Vega B. Association of Paraoxonase (PON1) Polymorphism with Risk of Neurotoxicity in Agricultural Workers *Epidemiology: November 2006 - Volume 17 - Issue 6 - p S347 ISEE/ISEA 2006 Conference Abstracts Supplement: Poster*.
- Gosselin R, Smith RP, Hodge HC. *Clinical toxicology of commercial products*. Williams & Wilkins, Baltimore. 1984.
- Gouedard C, Koum-Besson N, Barouki R, Morel Y. Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 945-956.
- Greenhalgh R, Dhawan KL, Weinberger P. Hydrolysis of fenitrothion in model and natural aquatic systems. *J Agric food Chem* 1980; 28: 102-105.
- Greenlee AR, Arbuckle TE, Chyou PH. Risk factors for female infertility in an agricultural region. *Epidemiology* 2003; 14: 429-36.
- Gregio D'Arce LP, Colus IM. Cytogenetic and molecular biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticides in Brazil. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 2000; 20: 161-70.
- Hanke W, Romitti P, Fuortes L, Sobala W, Mikulski M. The use of pesticides in a Polish rural population and its effect on birth weight. *Int Arch Occup Environ Health* 2003; 76: 614-20.
- Harkonen K, Viitanen T, Larsen SB, Bonde JP, Lahdetie J. Aneuploidy in sperm and exposure to fungicides and lifestyle factors. *Environ Mol Mutagen* 1999; 34: 39-46.
- Harnly M, McLaughlin R, Bradman A, Anderson M, Gunier R. Correlating Agricultural Use of Organophosphates with Outdoor Air Concentrations: A Particular Concern for Children *Environ Health Perspect* 2005; 113 (9): 1184-1189.
- Hassett C, Richter, RJ, Humbert R et al. Characterisation of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry* 1991; 30: 10141-10149.
- Hayes WJ, Laws ER. *Handbook of pesticide toxicology*, Acad Press, San Diego. 1991.
- Heacock H, Hogg R, Marion SA, Hershler R, Teschke K, Dimich-Ward H, et al. Fertility among a cohort of male sawmill workers exposed to chlorophenolate fungicides. *Epidemiology* 1998; 9: 56-60.
- Hill RH Jr, Shealy DB, Head SL, Williams CC, Bailey SL, Gregg M, Baker SE, Needham LL. Determination of pesticide metabolites in human urine using an isotope dilution technique and tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 1995; 19: 323-329.
- Hill RH Jr, Head SL, Baker S, Gregg M, Shealy DB, Bailey SL, Williams CC, Sampson EJ, Needham LL. Pesticide residues in urine of adults living in the United States: reference range concentrations. *Environ Res* 1995; 71: 99-108.
- Hodgson MJ, Block GD, Parkinson DK. Organophosphate poisoning in office workers. *J Occup Med* 1986; 28(6): 434-437.
- Hourani L, Hilton S. Occupational and environmental exposure correlates of adverse live-birth outcomes among 1032 US Navy women. *J Occup Environ Med* 2000; 42: 1156-65.
- Howard JK, East NJ, Chaney JL. Plasma cholinesterase activity in early pregnancy. *Arch Environ Health* 1978; 33: 277-278.
- Hoyos LS, Carvajal S, Solano L, Rodriguez J, Orozco L, Lopez Y, et al. Cytogenetic monitoring of farmers exposed to pesticides in Colombia. *Environ Health Perspect* 1996; 104(Suppl 3): 535-8.
- Ivashina SA. Interaction of Dursban with soil micro-organisms, *Agrokhimia* 1986; 8: 75-76.
- Iwata Y, O'Neal JR, Barkley JH, Dinoff TM, Dusch ME. Chlorpyrifos applied to California citrus: residue levels on foliage and on and in fruit. *J Agric Food Chem* 1983; 31(3): 603-10.
- James RW, Blatter Garin MC, Calabresi L et al. Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states. *Atherosclerosis* 1998; 139: 77-82.
- Jarrell J, Gocmen A, Foster W, Brant R, Chan S, Sevcik M. Evaluation of reproductive outcomes in women inadvertently exposed to hexachlorobenzene in southeastern Turkey in the 1950s. *Reprod Toxicol* 1998; 12: 469-76.

- Jarrell JF, Gocmen A, Akyol D, Brant R. Hexachlorobenzene exposure and the proportion of male births in Turkey 1935-1990. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 65-70.
- Joksic G, Vidakovic A, Spasojevic-Tisma V. Cytogenetic monitoring of pesticide sprayers. *Environ Res* 1997; 75: 113-8.
- Kaioumova DF, Khabutdinova LK. Cytogenetic characteristics of herbicide production workers in Ufa. *Chemosphere* 1998; 37: 1755-9.
- Kamrin MA. *Pesticide Profiles Toxicity. Environmental Impact, and Fate*; Lewis Publishers: Boca Raton, FL, 1997; pp. 147-152.
- Karalliedde L, Henry JA. Effects of organophosphates on skeletal muscle. *Hum Exp Toxicol* 1993; 12: 289-296.
- Karalliedde L, Senanayake N, Ariaratnam A. Acute organophosphorus insecticide poisoning during pregnancy. *Human Toxicol* 1988; 7: 363-364.
- Karmaus W, Wolf N. Reduced birthweight and length in the offspring of females exposed to PCDFs, PCP, and lindane. *Environ Health Perspect* 1995; 103: 1120-5.
- Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JAK. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 1994; 33, 832-839.
- Koch HM, Hardt J, Angerer J. Biological monitoring of exposure of the general population to the organophosphorus pesticides chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl by determination of their specific metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol. *Int J Hyg Environ Health* 2001; 204(2-3): 175-180.
- Kourakis A, Mouratidou M, Barbouti A, Dimikiotou M. Cytogenetic effects of occupational exposure in the peripheral blood lymphocytes of pesticide sprayers. *Carcinogenesis* 1996; 17: 99-101.
- Kristensen P, Irgens LM, Andersen A, Bye AS, Sundheim L. Birth defects among offspring of Norwegian farmers, 1967-1991. *Epidemiology* 1997; 8: 537-44.
- Kristensen P, Irgens LM, Andersen A, Bye AS, Sundheim L. Gestational age, birth weight, and perinatal death among births to Norwegian farmers, 1967-1991. *Am J Epidemiol* 1997; 146: 329-38.
- Kumar Bhagobaty R, Ram Joshi S, Malik A. Microbial Degradation of Organophosphorous Pesticide: Chlorpyrifos (Mini-Review). (2007). *The Internet Journal of Microbiology*. Vol. 4 Number 1.
- Kumon Y, Suehiro T, Ikeda Y and Hashimoto K. Human paraoxonase-1 gene expression by HepG2 cells is downregulated by interleukin-1, and tumor necrosis factor- α , but is upregulated by interleukin-6. *Life Sci* 2003; 73: 2807-28159.
- Lal S, Lal R. Bioaccumulation, metabolism, and effects of DDT, fenitrothion, and chlorpyrifos on *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Environ Contam Toxicol* 1987; 16: 753-757.
- Lander BF, Knudsen LE, Gamborg MO, Jarventaus H, Norppa H. Chromosome aberrations in pesticide-exposed greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health* 2000; 26: 436-42.
- Larsen SB, Joffe M, Bonde JP. Time to pregnancy and exposure to pesticides in Danish farmers. *ASCLEPIOS Study Group. Occup Environ Med* 1998; 55: 278-83.
- Larsen SB, Spano M, Giwercman A, Bonde J. Semen quality and sex hormones among organic traditional Danish farmers. *AESCEPIOS Study Group. Occup Environ Med* 1999; 56: 1139-44.
- Lee WJ, Alavanja MCR, Hoppin JA, Rusiecki JA, Kamel F, Blair A, Sandler DP. Mortality among Pesticide Applicators Exposed to Chlorpyrifos in the Agricultural Health Study *Environmental Health Perspectives* vol 115 number 4 April 2007.
- Lee, W.J, Blair A, Hoppin JA, Lubin JH, Rusiecki JA, Sandler DP. Dose-meci M, Alavanja MC, Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. *J Natl Cancer Inst* 2004; 1; 96(23): 1781-9.
- Levario-Carrillo M, Amato D, Ostrosky-Wegman P, Gonzalez-Horta C, Corona Y, Sanin LH. Relation between pesticide exposure and intrauterine growth retardation. *Chemosphere* 2004; 55(10): 1421-7.
- Levario-Carrillo M, Feria-Velasco A, De Celis R, Ramos-Martinez E, Cordova-Fierro L, Solis FJ. Parathion, a cholinesterase-inhibiting pesticide induces changes in tertiary villi of placenta of women exposed: a scanning electron microscopy study. *Gynecol Obstet Invest* 2001; 52: 269-75.
- Leviev I, James RW. Promoter polymorphisms of the human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler, Thromb Vasc Biol* 2000; 20, 516-521.
- Li WF, Costa LG, Richter RJ, Hagen T, Shih DM, Tward A, Lulis AJ, Furlong CE. Catalytic efficiency determines the in vivo efficacy of PON1 for detoxifying organophosphates. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 767-780.
- Loffredo CA, Silbergeld EK, Ferencz C, Zhang J. Association of transposition of the great arteries in infants with maternal exposures to herbicides and rodenticides. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 529-36.
- Lu C. Using Salivary Biomarker for Pesticide Exposure and Risk Assessment: Possibilities and Pitfalls *Epidemiology: November 2006 - Volume 17 - Issue 6 - p S135 ISEE/ISEA 2006 Conference Abstracts Supplement: Session Abstracts: Abstracts.*
- Lu C, Kedan G, Fisker-Andersen J, Kissel JC, Fenske RA. Multipathway organophosphorus pesticide exposures of preschool children living in agricultural and non agricultural communities *Environmental Research* 2004; 96: 283-289.
- Lu C, Knutson DE, Fisker-Andersen J, Fenske RA. Biological Monitoring Survey of Organophosphorus Pesticide Exposure among Preschool Children in the Seattle Metropolitan Area *Environmental Health Perspectives* Volume 109, Number 3, March 2001.
- Lu C, Toepel K, Irish R, Fenske RA, Barr DB, Bravo R. Organic Diets Significantly Lower Children's Dietary Exposure to Organophosphorus Pesticides *Environmental Health Perspectives* Volume 114, Number 2, February 2006.
- Lyon J, Taylor H, Ackerman B. A case report of intravenous malathion injection with determination of serum half-life. *Clin Toxicol* 1987; 25(3): 243-249.
- Mahajan R, Blair A, Lynch CF, Schroeder P, Hoppin JA, Sandler DP, Alavanja MC. Fonofos exposure and cancer incidence in the agricultural health study. *Environ Health Perspect* 2006 Dec; 114(12): 1838-42.
- Mahajan R, Bonner MR, Hoppin JA, Alavanja MC. Phorate exposure and incidence of cancer in the agricultural health study. *Environ Health Perspect* 2006 Aug; 114(8): 1205-9.
- Mandel JS, Alexander BH, Baker BA, Acquavella JF, Chapman P, Honeycutt R. Biomonitoring for farm families in the far family exposure study. *Scand J Work Environ Health* 2005; 31 Suppl 1: 98-104.
- Mantovani A, Maranghi F, La Rocca C, Tiboni GM, Clementi M. The role of toxicology to characterize biomarkers for agrochemicals with potential endocrine activities. *Reprod Toxicol* 2008; 26(1): 1-7
- McDonald RE, Nordby HE, McCollum TG. Epicuticular Wax morphology and composition are related to grapefruit chilling injury. *HortScience* 1993, 28: 311-3.
- McGready R, Simpson JA, Htway M, White NJ, Nosten F, Lindsay SW. A double blind randomized therapeutic trial of insect repellents for the prevention of malaria in pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001; 95: 137-8.
- McLaughlin JT, Sonneschein RR. Action of paraoxon (diethyl-4-nitrophenyl phosphate) on human sweat glands and the sympathetically reflex. *Acta Pharmacol Toxicol* 1960; 17: 7-17.
- Medina-Carrillo L, Rivas-Solis F, Fernandez-Arguelles R. Risk for congenital malformations in pregnant women exposed to pesticides in the state of Nayarit, Mexico. *Ginecol Obstet Mex* 2002; 70: 538-44.
- Milby TH, Epstein WL. Allergic contact sensitivity to malathion. *Arch Environ Health* 1964; 9: 434-437.
- Miles JRW, Harris CR, Tu CM. Influence of moisture on the persistence of chlorpyrifos and chlorfenvinphos in sterile and natural mineral and organic soils. *J Environ Sci Hlth* 1984; B19, 237-243.
- Ministero della Salute - Controllo ufficiale sui residui di prodotti fitosanitari negli alimenti di origine vegetale risultati in Italia anno 2002.

6. Clorpirifos e clorpirifos-metile

INTERFERENTI ENDOCRINI ■ SCHEDE MONOGRAFICHE

- Minton NA, Murray VSG. A review of organophosphate poisoning. *Med Toxicol* 1988; 3: 350-375.
- Mohammad O, Walid AA, Ghada K. Chromosomal aberrations in human lymphocytes from two groups of workers occupationally exposed to pesticides in Syria. *Environ Res* 1995; 70: 24-9.
- Munger R, Isacson P, Hu S, Burns T, Hanson J, Lynch CF, et al. Intrauterine growth retardation in Iowa communities with herbicide-contaminated drinking water supplies. *Am J Epidemiol* 1997; 105: 308-14.
- Munnecke DM, Hsieh DPH. Development of microbial systems for the disposal of concentrated pesticide suspensions. *Med Facul Landbouww Rijksuniv Gent* 1975; 40, 1237-1247.
- Namba T. Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical effects. *Bull World Health Organ* 1971; 44: 289-307.
- Namba T, Nolte CT, Jackrel J, Grob D. Poisoning due to organophosphate insecticides. *Am J Med* 1971; 50: 475-492.
- NIOSH. 1994. Manual of analytical methods (NMAM), fourth edition, Method 5600, organophosphorus pesticides. U. S. Department of Health and Human Services.
- Nolan RJ, Rick DL, Freshour NL, et al. Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicol Appl Pharmacol* 1984; 73(1): 8-15.
- NPIC Biomarkers of Exposure: Organophosphates Oregon State University, 333 Weniger Hall, Corvallis, Oregon 97331-6502 Phone: 1-800-858-7378 Fax: 1-541-737-0761 Email: npic@ace.orst.edu NPIC at <http://npic.orst.edu/>
- Nurminen T, Rantala K, Kurppa K, Holnberg PC. Agricultural work during pregnancy and selected structural malformations in Finland. *Epidemiology* 1995; 6: 23-30.
- Oliva A, Giami A, Multigner L. Environmental agents and erectile dysfunction: a study in a consulting population. *J Androl* 2002; 23: 546-50.
- Oliva A, Spira A, Multigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum Reprod* 2001; 16: 1768-76.
- Omar SA, Abdel-Sater MA. Microbial populations and enzyme activities in soil treated with pesticides. *Water Air and Soil Pollution* 2001; 127(1-4): 49-63.
- OSHA. 1986. Method 62. In: Manual of methods. Organic Methods Evaluation Branch, OSHA Analytical Laboratory, Occupational Safety and Health Administration, Salt Lake City, UT.
- Padovani L, Capri E. *Chemosphere* Volume 58, Issue 9, March 2005, Pages 1219-1229.
- Padungtod C, Hassold TJ, Millie E, Ryan LM, Savitz DA, Christinani DC, et al. Sperm aneuploidy among Chinese pesticide factory workers: scoring by the FISH method. *Am J Ind Med* 1999; 36: 230-8.
- Pastore LM, Hertz-Picciotto I, Beaumont JJ. Risk of stillbirth from occupational and residential exposures. *Occup Environ Med* 1997; 54: 511-8.
- Paz-y-Mino C, Bustamante G, Sanchez ME, Leone PE. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 1077-80.
- Perera FP, Rauh V, Tsai WY, Kinney P, Camann D, Barr D, et al. Effects of transplacental exposure to environmental pollutants on birth outcomes in a multiethnic population. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 201-5.
- Petrelli G, Figa-Talamanca I. Reduction in fertility in male greenhouse workers exposed to pesticides. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 675-7.
- Petrelli G, Figa-Talamanca I, Tropeano R, Tangucci M, Cini C, Aquilani S, et al. Reproductive male-mediated risk: spontaneous abortion among wives of pesticide applicators. *Eur J Epidemiol* 2000; 16: 391-3.
- Pometta D. Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur J Biochem* 1993; 211, 871-879.
- Potashnik G, Porath A. Dibromochloropropane (DBCP): a 17-year assessment of testicular function and reproductive performance. *J Occup Environ Med* 1995; 37: 1287-92.
- Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33, 498-507.
- Quing Li. New Mechanism of Organophosphorous Pesticide-induced Immunotoxicity. *J Nippon Med Sch* 2007; 74: 92-105.
- Racke KD, Coats JR. Enhanced biodegradation of insecticides in Midwestern corn soils. In: Racke KD and Coats JR (eds) *Enhanced biodegradation of pesticides in the environment*. ACS Symp Series 426, Washington, DC, pp. 68-81. 1990.
- Racke KD. Environmental fate of chlorpyrifos. *Rev Environ Contam Toxicol* 1993; 131, 1-151.
- Rastrelli L, Totaro K, De Simone F. Determination of organophosphorus pesticide residues in Cilento (Campania, Italy) virgin olive oil by capillary gas chromatography *Food Chemistry* 2002; 79: 303-305.
- Rauh VA, Garfinkel R, Perera FP, Andrews HF, Hoepner L, Barr DB, Whitehead R, Tang D, Whyatt RW. Impact of prenatal chlorpyrifos exposure on neurodevelopment in the first 3 years of life among inner-city children. *Pediatrics* 2006; 118(6): 1845-59.
- Recio R, Robbins WA, Borja-Aburto V, Moran-Martinez J, Froines JR, Hernandez RM et al. Organophosphorous pesticide exposure increases the frequency of sperm sex null aneuploidy. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 1237-40.
- Reichert ER, Klemmer HW, Haley TJ. A note on dermal poisoning from mevinphos and parathion. *Clin Tox* 1978; 12: 33-35.
- Reynolds EF. *Martindale: The Extra Pharmacopoeia*. 31st edition. The Royal Pharmaceutical Society, London. 1996.
- Richter RJ, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 745-753.
- Rigas ML, Okino MS, Quackenboss JJ. Use of a Pharmacokinetic Model to Assess Chlorpyrifos Exposure and Dose in Children, Based on Urinary Biomarker Measurements, *Toxicological Sciences* 2001; 61, 374-381.
- Roberts DM, Fraser JF, Buckley NA, Venkatesh B. Experiences of anticholinesterase pesticide poisonings in an Australian tertiary hospital. *Anaesth Intensive Care* 2005; 33: 469-76.
- Roberts, TR, Hutson, DH. *Metabolic Pathways of Agrochemicals - Part 2: Insecticides and Fungicides*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, UK, 1999; pp. 235-242.
- Rojas A, Ojeda ME, Barraza X. Congenital malformations and pesticide exposure. *Revista Medica Chile* 2000; 128: 399-404.
- Rose R, Hodgson E, Wallace A. Human Metabolism of New and Emerging Pesticides Project Name: Human Metabolism of New and Emerging Pesticides Annual Report 2006 Presentation: Human Metabolism of New and Emerging Pesticides.
- Rose RL, Tang J, Choi J, Cao Y, Usmani A, Cherrington N, Hodgson E. Pesticide metabolism in humans, including polymorphisms. *Scand J Work Environ Health* 2005; 31 suppl 1: 156-163.
- Rowntree DW, Nevin S, Wilson A. The effects of diazopropylfluorophosphate in schizophrenia and manic-depressive psychosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1950; 13: 47-62.
- Sallmen M, Liesivuori J, Taskinen H, Lindbohm ML, Anttila A, Aalto L, et al. Time to pregnancy among the wives of Finnish greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health* 2003; 29: 85-93.
- Sánchez-Pena LC, Reyes BE, Lopez-Carrillo L, Recio R, Moran-Martinez J, Cebrian ME, Quintanilla-Vega B. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2004; 196: 108-113.
- Savitz DA, Arbuckle TE, Kaczor D, Curtis KM. Male pesticide exposure and pregnancy outcome. *Am J Epidemiol* 1997; 146: 1025-36.
- Senanayake N, Karalliedde L. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides: an intermediate syndrome. *New Engl J Med* 1987; 316: 761-763.

- Senanayake N, Karalliedde L. Intermediate syndrome in anticholinesterase neurotoxicity. In: *Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates*. Eds. B Ballantyne & TC Marrs. Butterworth-Heinemann, Oxford, pp. 126-131. 1992.
- Shaw GM, Wasserman CR, O'Malley CD, Nelson V, Jackson RJ. Maternal pesticide exposure from multiple sources and selected congenital anomalies. *Epidemiology* 1999; 10: 60-6.
- Shih DM, Xia Y-R, Navab M, Li W-F, Hama S, Castellani LW, Furlong CE, Costa LG, Fogelman AM, Lusia AJ. Mice lacking serum paraoxonase are also susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 394: 284-287.
- Sinan S. *In vitro* inhibition of the paraoxonase from human serum with sulfonamide. *African Journal of Biotechnology* Vol. 7 (5), pp. 508-512, 4 March, 2008.
- Singh BK, Walker A, Morgan JAW, Wright DJ. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, No. 9, Sept. 2003, p. 5198-5206.
- Smegal DC. Human Health Risk Assessment Chlorpyrifos; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, Health Effects Division, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2000; pp. 1-131.
- Smith EM, Hammonds-Ehlers M, Clark MK, Kirchner HL, Fuortes L. Occupational exposures and risk of female infertility. *J Occup Environ Med* 1997; 39: 138-47.
- Suehiro T, Nakamura T, Inoue M et al. A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis* 2000; 150: 295-298.
- Suleyman Sandal, Bayram Yilmaz. Genotoxic effects of chlorpyrifos, cypermethrin, endosulfan and 2,4-D on human peripheral lymphocytes cultured from smokers and nonsmokers 2010 Wiley Periodicals, Inc. *Environ Toxicol*, 2010.
- Sultatos LG, Costa LG, Murphy SD. Factors involved in the differential acute toxicity of the insecticides chlorpyrifos and methyl chlorpyrifos in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982; 65(1): 144-152.
- Tait S, Ricceri L, Venerosi A, Maranghi F, Mantovani A, Calamandrei G. Long-Term Effects on hypothalamic neuropeptides following developmental exposure to chlorpyrifos in mice. *Environ Health Perspect* 2008.
- Takamiya K. Monitoring of urinary alkyl phosphates in pest control operators exposed to various organophosphorus insecticides. *Bull Environ Contam Toxicol* 1994; 52(2): 190-195.
- Thonneau P, Abell A, Larsen SB, Bonde JP, Joffe M, Clavert A, et al. Effects of pesticide exposure on time to pregnancy: results of a multicenter study in France and Denmark. *ASCLEPIOS Study Group. Am J Epidemiol* 1999; 150: 157-63.
- Thonneau P, Larsen SB, Abell A, Clavert A, Bonde JP, Ducot B, et al. Time to pregnancy and paternal exposure to pesticides in preliminary results from Danish and French studies. *ASCLEPIOS. Scand J Work Environ Health* 1999; 25(Suppl 1): 62-3.
- Thrasher JD et al. Immunological abnormalities in human chronically exposed to Chlorpyrifos. *Arch Environ Health* 2002; 57: 181-87.
- Tielemans E, Burdorf A, te Velde ER, Weber RF, van Kooij RJ, Veulemans H, et al. Occupationally related exposures and reduced semen quality: a casecontrol study. *Fertil Steril* 1999; 71: 690-6.
- Tielemans E, van Kooij R, Looman C, Burdorf A, te Velde E, Heederik D, Paternal occupational exposures and embryo implantation rates after IVF. *Fertil Steril* 2000; 74: 690-5.
- Tomenson JA, Taves DR, Cockett AT, McCusker J, Barraclough L, Francis M, et al. An assessment of fertility in male workers exposed to molinate. *J Occup Environ Med* 1999; 41: 771-87.
- Tomlin CDS. *The Pesticide Manual, A World Compendium*, 14th ed.; British Crop Protection Council: Alton, Hampshire, UK, 2006; p 186-187.
- USDA US. Department of Agriculture, Agricultural Marketing Service Pesticide Data Program Annual Summary, Calendar Year 2007; Washington, DC, 2008
- USDA, 2005 Pesticide Data Program. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture. Available: <http://www.ams.usda.gov/science/pdp>.
- USEPA Reregistration Eligibility Science Chapter for Chlorpyrifos Fate and Environmental Risk Assessment Chapter; , Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Office of Pesticide Programs, Environmental Fate and Effects Division, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 1999.
- USEPA, 1994 List of chemicals evaluated for carcinogenic potential.
- Valcke M, Bouchard M. Determination of no-observed effect level (NOEL)-biomarker equivalents to interpret biomonitoring data for organophosphorus pesticides in children *Environmental Health* 2009; 8: 5.
- Varona M, Cardenas O, Crane C, Rocha S, Cuervo G, Vargas J. Cytogenetic alterations in workers exposed to pesticides in floriculture in Bogota (Spanish). *Biomedica* 2003; 23: 141-52.
- Venerosi A, Cutuli D, Colonnello V, Cardona D, Ricceri L, Calamandrei G. Neonatal exposure to chlorpyrifos affects maternal responses and maternal aggression of female mice in adulthood. *Neurotoxicol Teratol*. 2008.
- Verhulst HL, Crotty JJ. Di-isopropyl fluorophosphate. *Natl Clgh Poison Control Cent Bull*, May-June. 1965.
- Villeneuve DC, Willes RF, Lacroix JB, Phillips WEJ. Placental transfer of C14-parathion administered intravenously to sheep. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972; 212: 542-548.
- Von Kaulla K, Holmes JH. Changes following anticholinesterase exposure. Blood coagulation studies. *Arch Environ Health* 1961; 2: 168.
- Weidner IS, Moller H, Jensen TK, Skakkebaek N. Cryptorchidism and hypospadias in sons of gardeners and farmers. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 793-6.
- Weis OF, Muller FO, Lyall H, Badenhorst CH et al. Maternofetal cholinesterase inhibitor poisoning. *Anaesth Analg* 1983; 62: 233-235.
- WHO. Organophosphorus insecticides: a general introduction. *Environmental Health Criteria* 63. WHO, Geneva, 181 pp. 1986.
- Wolfe HR, Staiff DC, Armstrong JF. Exposure of pesticide formulating plant workers to parathion. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1978; 20: 340-343.
- Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberration and single cell gel electrophoresis (Comet) assay in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Mutagenesis* 2001; 16: 359-63.