



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE

FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA
in

SCIENZE DELLE PROFESSIONI SANITARIE DELLA PREVENZIONE

TESI DI LAUREA SPERIMENTALE

in

NEUROLOGIA

**RUOLO DELLE NEUROTOSSINE AMBIENTALI NELLA
PATOGENESI DELLE MALATTIE
NEURODEGENERATIVE:
META-ANALISI DEGLI STUDI DI ASSOCIAZIONE TRA
PARAQUAT E MORBO DI PARKINSON.**

RELATORE:
Chiar.mo Prof.
Alfonso DI COSTANZO

LAUREANDO:
Mauro LOPOPOLO
Matr. 133391

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

INDICE

INTRODUZIONE	6
CAPITOLO 1 – LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE	
1.1 I fattori di rischio.....	12
1.2 Sistema nervoso centrale e periferico.....	13
1.3 Possibili meccanismi di azione.....	14
1.4 Cenni su disturbi cognitivi e l'inquinamento ambientale.....	15
1.5 Cenni e classificazione sulle più comuni malattie neurodegenerative.....	16
1.5.1 La Malattia di Parkinson.....	17
1.5.1.1 Fattori eziologici.....	18
1.5.1.2 Quadro sintomatologico.....	21
1.5.1.3 Prospettive.....	24
CAPITOLO 2 – SOSTANZE NEUROTOSSICHE	
2.1 Neurotossicità.....	26
2.2 Inquinanti chimici.....	27
2.2.1 Sostanze chimiche neurotossiche.....	28
2.2.2 L'esposizione ai pesticidi aumenta il rischio di Parkinson.....	34
2.3 I pesticidi.....	35
2.3.1 Definizioni.....	35
2.3.2 Legislazione.....	36
2.3.3 Usi.....	37
2.3.4 Classificazione dei pesticidi.....	39
2.3.4.1 Classificazione chimica.....	39
2.3.4.2 Classificazione funzionale.....	40
2.3.4.3 Classificazione tossicologica.....	42
2.3.5 Paraquat.....	44
2.3.6 Seccatutto.....	47
2.3.7 Esposizione sull'uomo e interazione con l'ambiente.....	51
2.3.8 I soggetti esposti.....	51

2.3.9	Uso incontrollato di pesticidi.....	52
2.3.10	Uno sguardo ai bambini.....	53
2.3.11	Interazione con l'ambiente.....	54

CAPITOLO 3 – SISTEMI DI PREVENZIONE

3.1	Introduzione.....	56
3.2	Epidemiologia come collegamento fra fattori di rischio, effetti sulla salute e prevenzione.....	57
3.2.1	Percezione e comunicazione del rischio.....	58
3.3	Monitoraggio dell'esposizione e sorveglianza della salute.....	59
3.4	I fattori di rischio: definizioni.....	60
3.5	Valutazione del rischio (risk assessment).....	60
3.5.1	Inquadramento della valutazione del rischio.....	61
3.5.2	L'analisi/identificazione dei rischi all'uso dei pesticidi.....	61
3.6	Prevenzione dei rischi per la salute, derivante dall'uso dei pesticidi.....	65
3.6.1	Effetto deriva e possibile riduzione delle perdite aeree nella distribuzione dei pesticidi.....	66
3.6.2	I dispositivi di protezione individuale.....	67
3.6.3	I tempi di rientro.....	68

CAPITOLO 4 – I PIANI SANITARI NAZIONALI IN ITALIA ED EVIDENZE BASATE SULLA PREVENZIONE

4.1	Introduzione.....	69
4.2	Salute e Ambiente.....	70
4.3	Il Piano Sanitario Nazionale 2011-2013.....	71
4.3.1	Il Sistema Sanitario Nazionale nel contesto Europeo e Internazionale: la "Carta di Tallinn"	71
4.3.2	Il Sistema Sanitario Nazionale nel contesto Europeo e Internazionale: esperienze internazionali.....	72
4.3.3	Il Piano Sanitario Nazionale 2011-2013: le linee prioritarie di sviluppo.....	72
4.3.4	Il Piano Sanitario Nazionale 2011-2013: le criticità da affrontare.....	73

4.3.5	Il Piano Sanitario Nazionale 2011-2013: azioni per lo sviluppo del sistema.....	73
4.4	Il Piano Sanitario della Prevenzione 2010-2012.....	78
4.4.1	Principi della prevenzione.....	78
4.4.2	Metodi e approccio del PNP.....	79
4.4.3	La prevenzione nella popolazione a rischio: le malattie neurologiche.....	81
4.4.4	La prevenzione delle complicanze e recidive di malattia: la sfida della cronicità.....	81
4.5	Le prove di efficacia in Sanità Pubblica.....	82
4.5.1	Evidence Based Prevention (EBP)	83
4.5.2	Valutazione delle evidenze di un intervento.....	84

CAPITOLO 5 – META-ANALISI DEGLI STUDI DI ASSOCIAZIONE TRA PARAQUAT E MORBO DI PARKINSON

5.1	Obiettivi dello studio.....	86
5.2	Concetti basilari del disegno dello studio.....	87
5.3	Gli studi osservazionali (di coorte, trasversale, caso-controllo)	88
5.3.1	Disegno dello studio caso-controllo.....	89
5.3.2	Punti di forza e limitazioni.....	90
5.3.3	La collocazione temporale.....	91
5.4	Studi descrittivi e le associazioni degli studi.....	91
5.5	La meta-analisi negli studi osservazionali.....	91
5.5.1	Definizione di meta-analisi.....	92
5.5.2	Riassumere la letteratura attraverso le meta-analisi.....	92
5.5.3	Metodi meta-analitici.....	93
5.5.4	La meta-analisi come strumento per l'elaborazione di politiche di igiene ambientale.....	96
5.6	Questionari.....	98
5.7	Confondimento.....	99
5.8	La distorsione (bias)	100
5.9	Validità degli studi.....	102
5.10	Cochrane Collaboration.....	102

5.11 I metodi meta-analitici.....	104
5.11.1 I metodi di correlazione “Mantel-Haenszel”	104
CAPITOLO 6 – MATERIALI E METODI	
6.1 Le revisioni sistematiche.....	106
6.2 Misura del rischio: odds ratio (OR) e rischio relativo (RR)	107
6.2.1 Interpretazione dell’odds ratio e del rischio relativo.....	109
6.3 Errore standard e limiti fiduciali.....	109
6.4 La meta-analisi.....	110
6.5 Metodica di selezione e di inclusione degli studi.....	112
6.6 Il Forest Plot.....	115
6.7 Differenze di metodo e di modello.....	117
6.8 Valore del test statistico di eterogeneità nel Forest Plot.....	118
6.9 Test di eterogeneità.....	118
6.9.1 Indice di eterogeneità di Higgins (I^2)	119
6.9.2 Indagare le cause di eterogeneità.....	119
6.10 Prove di significatività.....	120
6.11 Il test del chi-quadro (o chi-quadrato)	122
CAPITOLO 7 – RISULTATI	
7.1 Analisi dei dati complessivi.....	124
7.2 Interpretazione dei risultati.....	125
7.3 Altro studio effettuato (study removed)	126
CAPITOLO 8 – DISCUSSIONE.....	
	127
CAPITOLO 9 – CONCLUSIONI.....	
	130
TABELLE E GRAFICI.....	
	134
BIBLIOGRAFIA.....	
	141

INTRODUZIONE

Le malattie di Parkinson (PD) e di Alzheimer (AD), le due più comuni malattie neurodegenerative, stanno avendo un continuo e crescente incremento nella popolazione mondiale. Da numerosi studi condotti, questi tipi di malattie sono di origine puramente genetica in una minoranza dei casi, mentre nella maggior parte dei casi sembrano manifestarsi a causa dell'interazione tra fattori genetici ed ambientali. È stato inoltre ipotizzato che l'esposizione ambientale ad alcuni agenti tossici nelle fasi iniziali della vita può essere di particolare importanza eziologica specie nelle malattie neurodegenerative¹.

Molte disfunzioni neurologiche, sconosciute diversi anni fa, ed ora da considerare quasi epidemiche, sono con grande probabilità conseguenze dell'azione di varie neurotossine ambientali e di inquinanti alimentari. L'esposizione alle sostanze tossiche ambientali comporta una risposta strettamente individuale che dipende dall'assetto biochimico e immunologico personale.

Negli ultimi tre decenni, la ricerca scientifica ha condotto studi al fine di individuare il rapporto tra l'esposizione ad una tossina ambientale e l'insorgenza di una patologia neurologica o di un deficit neuropsicologico.

Si possono delineare in questa ricerca tre momenti:

- a) definizione della “storia degli agenti neuroinquinanti”, dalla fonte alla diffusione e al monitoraggio ambientale;
- b) caratterizzazione dell'incontro tra sostanza neurotossica e organismo, nel percorso che va dall'interazione con cute e mucose, all'assorbimento e all'eliminazione dell'agente tossico;
- c) comprensione e proposta di modelli esplicativi su come l'omeostasi di un sistema complesso come quello nervoso venga alterata a tal punto da creare una situazione patologica.

Indubbiamente le ricerche sperimentali, la medicina del lavoro e l'epidemiologia contribuiscono a chiarire il complesso rapporto tra uomo e ambiente, perché da un lato studi su colture cellulari e animali da laboratorio evidenziano meccanismi

¹ Landrigan PJ, et al. *Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life*. Environ Health Perspect, 2005, 113(9), p. 1230-1233.

biochimici, dall'altro la valutazione dello stato di salute di alcune categorie di lavoratori e sottogruppi di individui della popolazione generale, esposti a sostanze neurotossiche, è estremamente utile per affrontare il problema in termini di sanità pubblica.

Inoltre negli ultimi anni, si è assistito ad una sovrapposizione tra gli ambienti di lavoro e quelli di vita, sia per la presenza di categorie di lavoratori che esercitano la loro attività nel tessuto urbano (benzinai, vigili urbani, netturbini, meccanici, ecc.), sia per il peggioramento delle condizioni ambientali in generale che comportano ad esempio la residenza in prossimità di fonti inquinanti (discarica, sito industriale, corsi d'acqua, ecc.).

Nei paesi occidentali, esistono limiti ambientali e biologici che tutelano la salute dei lavoratori e della popolazione generale, a differenza dei paesi in via di sviluppo, dove la situazione probabilmente è molto diversa, e le differenze sul piano normativo dovrebbero essere analizzate in maggior dettaglio, per comprenderne le possibili conseguenze sanitarie.

I metalli, i solventi e i pesticidi, sono sostanze comunemente considerate neurotossiche, anche se in ambito neurotossicologico non esiste un sistema classificativo analogo a quello proposto dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) per le sostanze cancerogene. Solo recentemente, un gruppo scandinavo ha avviato tale classificazione utilizzando una metodologia molto simile a quella della IARC, e classificando le sostanze in quattro gruppi: sostanza neurotossica per l'uomo, probabilmente neurotossica, possibilmente neurotossica, non neurotossica. Sono state finora classificate cinque sostanze come neurotossiche per l'uomo (alluminio, manganese, n-esano, tricloroetilene, triortocresilfosfato)².

Schematicamente i seguenti quattro aspetti hanno importanza clinico-epidemiologica nelle interazioni tra fattori ambientali e sistema nervoso:

- a) frequenza e caratteristiche cliniche di una intossicazione acuta da neurotossina;

² Simonsen L, et al., *Methodological approach to evaluation of neurotoxicity data and the classification of neurotoxic chemicals*, Scand J Work Environ Health, 1994, 20, p. 1-12.

- b) frequenza e caratteristiche cliniche delle sequele croniche ad una intossicazione acuta da neurotossine;
- c) rapporto tra l'esposizione cronica a neurotossine a basse concentrazioni e l'insorgenza di una patologia neurologica, inclusi i deficit delle funzioni nervose superiori.

Attualmente è assolutamente elevato il numero di persone che manifestano, nei confronti di sostanze tossiche ambientali o di alimenti contaminati, reazioni critiche, alla lunga responsabili di disfunzioni sistematiche, capaci di minare la salute. Inoltre, soprattutto nei paesi in via di sviluppo, i bambini che sono già venuti molto spesso a contatto con sostanze tossiche attraverso la placenta della madre crescono in un ambiente malsano, muovendosi a livello dei tubi di scappamento delle automobili, bevendo acqua contaminata e mangiando alimenti inquinati³.

L'ambiente è invaso da molecole chimiche di sintesi (pesticidi in agricoltura, antibiotici e farmaci in campo medico e zootecnico, additivi alimentari, ecc..) con effetti tossici, teratogeni, mutageni e cancerogeni. Sono in continuo aumento le malattie neoplastiche soprattutto nei bambini, tra cui si annoverano soprattutto, quelle neurodegenerative ed endocrino-metaboliche.

La continua esposizione dell'organismo umano a inquinanti ambientali genera reazioni infiammatorie e riparative anomale che possono provocare malattie immunitarie e neurodegenerative (Alzheimer, Parkinson, Sclerosi laterale amiotrofica, ecc..). Le trasformazioni ambientali degli ultimi cent'anni, hanno poi cambiato l'esposizione della specie umana, processo, forse il più inquietante, è l'azione diretta degli inquinanti ambientali sull'embrione e sul feto durante la gestazione, con alterazione delle cellule che formeranno i tessuti e gli organi deputati al controllo metabolico; ciò produce malattie nei nuovi nati che si manifestano in tempi variabili e talvolta dopo lunga latenza clinica.

È noto che gli inquinanti ambientali, agiscono anche sul patrimonio genetico del prodotto del concepimento, sulle cellule germinali (oociti e spermatozoi), e sulle cellule somatiche staminali dell'adulto, provocando mutazioni genetiche. Varie

³ Harari R, et al., *Unacceptable "occupational" exposure to toxic agents among children in Ecuador*, Am J Ind Med, 1997, 32, p. 185-189.

patologie, come certi tumori, sono prodotte più che dal patrimonio genomico dell'individuo dall'epigenoma, ossia dall'azione di fattori ambientali sui geni, con malattie ereditarie a lunga scadenza, anche transgenerazionali.

Un esempio, molti elementi tossici e cancerogeni, infatti, presenti anche a livelli ritenuti ammissibili per legge nelle acque consumate da soggetti adulti, possono nel periodo della gravidanza, attraverso l'esposizione materno-fetale (acque contaminate), possono essere assunte cronicamente, superare la barriera placentare ed ematocerebrale fetale, e quindi compromettere la salute del futuro nascituro, aumentando il rischio di malattie in età infantile e adulta. Patologie del neurosviluppo (NDD) – autismo, disturbo da deficit dell'attenzione (ADD, attention deficit disorder), disturbo dell'attenzione da iperattività (ADHD, attention deficit hyperactivity disorder) e ritardo mentale, come un aumentato rischio di morbo di Parkinson, morbo di Alzheimer e altre malattie neurodegenerative e neoplastiche, sono infatti, con sempre maggiori evidenze scientifiche, correlate anche all'esposizione materna a inquinanti chimici ambientali veicolati anche attraverso l'assunzione di acqua.

In uno studio pubblicato sulla rivista scientifica "The Lancet" nel 2006, Grandjean e Landigran⁴, identificarono circa 202 sostanze chimiche industriali, capaci di danneggiare il cervello umano.

Parallelamente a queste azioni, deve iniziare però anche una sana politica di trasformazione e controllo, di tutte quelle attività che immettono nell'ambiente un numero sempre più elevato di sostanze tossiche e dagli effetti ancora poco conosciuti.

Evento importante fu il *Brain Forum* di Roma nel 2010, ove si discusse di un'importante ricerca condotta da alcuni studiosi del Medio-Oriente (Israele), ove l'oggetto principale, erano le complesse interazioni tra geni e ambiente che causano il morbo di Parkinson.

L'incidenza molto diversa di questa malattia, in zone differenti della Terra, rivela l'influenza congiunta di corredi genetici variabili nelle diverse popolazioni

⁴ Grandjean P, Landrigan P. *Developmental neurotoxicity of industrial chemicals*, The Lancet, 2006, 368(9553), p. 2167-2178.

umane, ma anche l'impatto di fattori ambientali, specialmente quello degli insetticidi in uso in agricoltura.

La rottura del delicato equilibrio tra quelle molecole che mediano i contatti tra i neuroni, i cosiddetti neuro-trasmettitori, progredisce con l'avanzare dell'età e aumenta la suscettibilità al rischio, specie in soggetti portatori di certe varianti genetiche ed esposti agli insetticidi. È ben noto e molto intuitivo che lo stress altera il sistema immunitario, aumentando il rischio di contrarre malattie.

L'uso di insetticidi, produce stress immunitario e aumenta, specie negli anziani, il rischio di contrarre il morbo di Parkinson conseguentemente al contatto.

Qualche dato sul Parkinson: colpisce in media, nel mondo, l'uno per cento di coloro che hanno oltre 65 anni, ed è il numero due tra le malattie neurodegenerative. Chi vive in zone rurali è maggiormente soggetto e si è tracciata una mappa mondiale dell'incidenza, che comprende anche l'Italia.

Altro fattore da considerare, è lo stress ossidativo. Infatti, quando i radicali liberi sono presenti in eccesso nell'organismo, sono dei temibili nemici che giorno dopo giorno minano la nostra salute.

Ogni giorno, sono innumerevoli le situazioni che mettono a dura prova il nostro benessere, ad esempio: le diverse forme di inquinamento, da quello idrico e alimentare, a quello ambientale; i ritmi oramai frenetici che comportano uno stile di vita poco salutare; le diete spesso squilibrate; e il vizio del fumo e dell'alcol, da una pratica eccessiva di attività fisica, per citarne soltanto alcune.

Il nostro corpo, quando si trova in un buono stato di salute, è in grado di eliminare e di tenere sotto controllo i radicali liberi, tramite il proprio sistema antiossidante.

Il problema è però, che questo sistema difensivo di cui siamo tutti dotati, spesso non ce la fa, soprattutto nei soggetti in età avanzata.

D'altra parte il cervello, è particolarmente sensibile ai radicali liberi, per una serie di motivi ben noti: ha un basso contenuto di composti antiossidanti; ha un elevato contenuto di acidi grassi polinsaturi nelle membrane dei neuroni che rappresentano potenziali target di danni ossidativi; ha una limitata capacità di rigenerazione; e non ultimo ha un elevato metabolismo locale dell'ossigeno. Infatti l'encefalo, pur rappresentando solo il 2% del peso corporeo, consuma circa il 20% di tutto l'ossigeno disponibile.

Questa caratteristica, assieme a quelle fisiologiche elencate, lo rendono particolarmente sensibile agli assalti dei radicali liberi. Per questo motivo, proprio alcune molecole che caratterizzano lo stress ossidativo, rappresentano un indicatore precoce per i soggetti colpiti da patologie neurodegenerative⁵.

Pertanto, per prevenire il danno ossidativo, bisogna limitare le esposizioni ai fattori di rischio.

⁵ Aruoma Ol, Grootveld M, Bahorun T. *Free radicals in biology and medicine: from inflammation to biotechnology*. Biofactors, 2006; 27(1-4), p. 1-3.

CAPITOLO 1

LE MALATTIE NEURODEGENERATIVE

Le malattie neurodegenerative sono un gruppo eterogeneo di patologie, inerenti specifiche aree del sistema nervoso centrale (SNC), la cui sintomatologia è caratterizzata da una progressiva compromissione cognitiva e/o motoria, a seconda del tipo di cellule neuronali interessate. Esse tutt'oggi rappresentano un problema per la scienza medica, dal momento che le cause eziologiche sono note solo in parte, e il loro decorso è spesso silente (asintomatico), ma progressivo, accompagnato da un graduale decadimento delle condizioni psico-fisiche e della qualità della vita. Infatti, tali malattie sono caratterizzate da un processo cronico di morte neuronale.

Definire con precisione una malattia neurodegenerativa è purtroppo ancora oggi piuttosto complesso, in quanto la degenerazione dei tessuti neuronali è alla base di una serie di malattie non classificate solitamente come neurodegenerative (ad esempio la sclerosi multipla, l'epilessia, la schizofrenia, e perfino alcuni tumori) mentre, al contrario, alcune malattie neurodegenerative sono fortemente correlate anche dall'insorgenza di processi infiammatori e da disfunzioni vascolari.

1.1 I fattori di rischio

Il tentativo di chiarire i fattori di rischio, soprattutto nel caso dell'Alzheimer e del Parkinson, è stato piuttosto deludente negli anni. Gli unici fattori di rischio per questa malattia identificati finora sono: l'età, la familiarità, la predisposizione genetica, e l'esposizione ad alcune sostanze tossiche. Altri fattori di rischio implicati sono: il sesso, basse concentrazioni lipidiche, infiammazioni sistemiche, una storia di danni cerebrali o di traumi alla testa^{1,2,3}.

¹ Dick FD, et al. *Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study*. *Occup Environ Med*. 2007; 64(10), p. 666-672.

² Perry V.H., et al. *Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration*. *Nat. Rev. Immunol*. 2007; 7, p. 161-167.

³ Van Den Heuvel C., et al. *Traumatic brain injury and Alzheimer's disease: a review*. *Prog. Brain Res*. 2007; 161, p. 303-316.

Non esiste ancora una modalità di trattamento efficace delle forme di demenza, nella maggior parte dei casi i trattamenti sono sintomatici.

Stati di depressione, ansia, cambiamenti della personalità, irritabilità, sono tutti disturbi che accompagnano il progredire della demenza, e si manifestano nel 90% dei soggetti. Nelle fasi precoci della demenza, questa viene spesso scambiata per una condizione di depressione.

1.2 Sistema nervoso centrale e periferico

Le esposizioni ambientali a neurotossine nei luoghi di lavoro rappresentano un rischio significativo per la salute pubblica⁴. Gli agenti neurotossici possono essere classificati secondo la struttura anatomica su cui agiscono:

- guaina mielinica, incluse le cellule che la producono a livello centrale (oligodendrociti) e a livello periferico (cellule di Schwann);
- neuroni centrali e astrociti (nella materia grigia);
- assoni e pericarion di neuroni periferici;
- giunzioni sinaptiche.

Il sistema nervoso centrale (SNC) è relativamente protetto dalle numerose sostanze tossiche, grazie alla barriera ematoencefalica (BBB, blood brain barrier). I neuroni in alcuni tessuti (es. gangli del midollo spinale e gangli autonomi) del sistema nervoso periferico (SNP) sono suscettibili alle sostanze tossiche che si insinuano attraverso gli spazi tra le cellule epiteliali. Il danno neurologico deriva dalla penetrazione selettiva di sostanze chimiche tossiche attraverso le barriere protettive del SNC e del SNP in sedi anatomiche specifiche. I danni più gravi e irreversibili avvengono con la morte del neurone, dato che la cellula differenziata non può dividersi per essere sostituita. Quando muore il neurone, altre cellule con le stesse funzioni sono in grado di sostituire le cellule morte, o altri neuroni possono acquisire le funzioni necessarie, in tali casi il recupero può avvenire in un tempo più lungo, oppure mai. Se fallisce questo meccanismo di riparazione, si manifesta una perdita di funzione in rapporto alla gravità dell'insulto tossico. Generalmente, dopo un insulto neurotossico, avviene il recupero di alcune funzioni. Quando non interviene la morte cellulare, il recupero avviene

⁴ Aldrich T., Griffith J. *Environmental Epidemiology and Risk Assessment*. Van Nostrand Reinhold, New York, 1993.

velocemente (dopo che l'agente tossico è stato metabolizzato), o comunque dopo che la rigenerazione biologica ha avuto luogo.

1.3 Possibili meccanismi di azione

Le attuali conoscenze sull'origine delle malattie neurodegenerative è spesso sconosciuta, ma dati di letteratura evidenziano uno stretto legame tra fattori ambientali, quali esposizione a sostanze chimiche (idrocarburi, pesticidi, solventi, n-esano e suoi metaboliti, metalli pesanti, farmaci antinausea ad azione centrale, antipsicotici) e reazioni individuali (stress ossidativo e nitrosilante, glicosilazione, meccanismi infiammatori) che determinano un perdurare nel tempo di alti livelli di neurotrasmettitori eccitatori.

La ricerca scientifica sta iniziando a porre una maggiore attenzione, oltre ai fattori genetici predisponenti, anche a fattori ambientali, quali: stili di vita in contesti rurali o industrializzati, esposizione a fattori inquinanti per motivi occupazionali; assunzione di cibo contaminato; o utilizzo di materiali e manufatti che possono rilasciare sostanze tossiche^{5,6}. Attualmente, nel caso del morbo di Parkinson, le cause ambientali appaiono avere un ruolo più determinante della predisposizione genetica. Si ritiene, infatti, che la malattia sia il risultato dell'interazione di fattori ambientali, a cui un individuo può essere esposto nel corso della sua vita. Ricerche epidemiologiche hanno evidenziato che molti individui affetti da Parkinson sono stati esposti in misura maggiore rispetto ai controlli a sostanze quali erbicidi, insetticidi, oppure hanno svolto attività agricole.

La malattia di Parkinson può dipendere anche da altre forme di inquinamento ambientale, e in particolare da sostanze prodotte da alcuni microrganismi quali: batteri, funghi e piante. L'esposizione a questi fattori tossici, come pure la loro ingestione, potrebbe facilitare una disfunzione genetica che inibisce il sistema regolatorio delle proteine, con accumulo di proteine degradate, e conseguente degenerazione dei neuroni.

Anche per la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA) si è evidenziato che all'insorgenza della malattia concorrono cause di tipo ambientale, come

⁵ Brown RC, et al. *Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors*. Environ Health Perspect. 2005;113(9), p. 1250-1256.

⁶ Migliore L, Coppedè F. *Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases*. Mutat Res., 2002; 512(2-3), p. 135-153.

l'esposizione ad agenti tossici, quali metalli pesanti (e in particolare piombo, manganese e mercurio), pesticidi e solventi chimici. Tra gli agenti tossici, quelli maggiormente chiamati in causa sono i pesticidi e i fertilizzanti⁷; in effetti, tali sostanze utilizzate anche per la manutenzione del campo da gioco, potrebbero essere responsabili, oltremodo, dell'insorgenza della malattia tra i calciatori. Forse è più suggestiva la responsabilità addossata all'esuberante produzione di radicali liberi in corso di intensa attività sportiva, o al ricorso a determinate sostanze "dopanti" o, infine, all'alimentazione di questi atleti, pur non essendovi esaustive documentazioni al riguardo^{8,9,10}.

1.4 Cenni su disturbi cognitivi e l'inquinamento ambientale

Il cervello umano in via di sviluppo, è molto più suscettibile al danneggiamento causato da agenti tossici, rispetto al cervello strutturato in età adulta.

È sempre più chiaro il nesso causale tra patologia dei bambini/adolescenti e l'esposizione (attraverso acqua, aria, cibo) a diverse classi di xenobiotici, composti chimici o fisici dell'ambiente, dalla vita embrionale e fetale all'adolescenza. Questo comporterebbe una maggiore frequenza di disturbi neurologici e cognitivi (es. il caso del piombo e del mercurio o dei composti organici volatili)^{11,12,13}. I bambini sono più vulnerabili all'inquinamento rispetto agli adulti, perché il sistema nervoso in questa età si sviluppa molto più rapidamente, come anche tutto lo sviluppo cognitivo.

⁷ Bento-Abreu A, et al. *The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis*. Eur J Neurosci. 2010; 31(12), p. 2247-2265.

⁸ Belli S, Vanacore N. *Sports and amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurol Sci. 2008; 269(1-2), p. 191-192.

⁹ Belli S, Vanacore N. *Proportionate mortality of Italian soccer players: is amyotrophic lateral sclerosis an occupational disease?* Eur J Epidemiol. 2005; 20(3), p. 237-242.

¹⁰ Vanacore N, et al. *Amyotrophic lateral sclerosis in an Italian professional soccer player*. Parkinsonism Relat Disord. 2006; 12(5), p.327-329.

¹¹ Schwartz BS, et al. *Past adult lead exposure is associated with longitudinal decline in cognitive function*. Neurology 2000; 55(8), p. 1144–1150.

¹² Needleman HL, et al. *The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. An 11-year follow-up report*. N Engl J Med, 1990; 322, p. 83–88.

¹³ Canfield RL, et al. *Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter*. N Engl J Med, 2003; 348(16), p. 1517–1526.

Siamo forse davanti alla presenza di diversi effetti tossici dose-dipendenti, le cui dimensioni sono ancora sconosciute¹⁴, e che certamente richiedono da parte della comunità scientifica, un grande sforzo nel cercare di studiare e quindi prevedere la gravità e gli effetti, soprattutto a lungo termine, con particolare riferimento all'esposizione di contaminanti chimici e fisici, durante tutto lo sviluppo dell'individuo che può portare allo sviluppo di malattie cronico-degenerative, colpendo i più svariati comparti biologici dell'uomo.

1.5 Cenni e classificazione sulle più comuni malattie neurodegenerative

L'origine incerta, il coinvolgimento di determinati gruppi di neuroni, e la coincidenza di alcune manifestazioni cliniche in malattie neurodegenerative diverse, ha sempre reso difficoltosa la classificazione di queste patologie, la quale è stata più volte rivisitata.

Considerando come unico criterio classificativo, la principale localizzazione delle lesioni nel sistema nervoso, è possibile distinguere forme che interessano la corteccia cerebrale, i gangli della base, oppure i neuroni motori, e ancora forme che colpiscono il midollo spinale e il cervelletto.

a) Patologie della corteccia cerebrale:

malattie che interessano la corteccia, sono il morbo di Alzheimer che si evidenzia clinicamente dai cinquanta ai sessantacinque anni, ed è caratterizzato da atrofia diffusa della corteccia e della regione sottocorticale, e dall'ingrandimento dei solchi e dei ventricoli cerebrali.

b) Patologie dei gangli della base:

come il nucleo caudato e il putamen, i quali svolgono un ruolo estremamente importante nei meccanismi di controllo dei movimenti del corpo e degli arti. Tra le patologie di quest'area, vi è il morbo di Parkinson, (o parkinsonismo), che si manifesta generalmente dopo i cinquant'anni di età, è caratterizzato dalla comparsa di disturbi motori; caratteristici sono il tremore, la rigidità e l'andatura a piccoli passi, a cui si associa la scomparsa dei movimenti mimici del volto, a causa del coinvolgimento dei cosiddetti muscoli facciali.

c) Patologie dei neuroni motori (motoneuroni):

¹⁴ Grandjean P, Landrigan PJ. *Developmental neurotoxicity of industrial chemicals*. The Lancet, 2006; 368(9553), p. 2167-2178.

strutture che situate nella corteccia e nelle corna anteriori del midollo spinale, innervano le fibre dei muscoli striati (motoneuroni alfa). La patologia che interessa quest'area, è la sclerosi laterale amiotrofica che colpisce più frequentemente i soggetti con età compresa tra i trenta e i cinquant'anni, interessa i neuroni motori localizzati sia nella corteccia cerebrale sia nel midollo spinale. Si evidenzia clinicamente con la comparsa di atrofia e paralisi della muscolatura degli arti, dei muscoli innervati dai nervi cranici e dei muscoli respiratori. La malattia ha un decorso rapido e può portare al decesso in un periodo di tempo inferiore ai tre anni.

Tra le patologie neurodegenerative, le più frequenti sono:

- La malattia di Alzheimer (MA): caratterizzata da un graduale e progressivo decadimento delle funzioni cognitive, quali: la memoria, il giudizio, la critica, il ragionamento.
- La malattia o Morbo di Parkinson (MP): caratterizzata clinicamente da tremore a riposo, bradicinesia, rigidità ed instabilità posturale.
- La Sclerosi Multipla (SM): caratterizzata all'esordio da disturbi motori e di sensibilità, seguiti da deficit dell'equilibrio, deficit visivo, disturbi urinari, intestinali e della sfera sessuale.
- La Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA): caratterizzata da atrofia muscolare ingravescente, fascicolazioni, crampi muscolari, iperreflessia e successivamente da fenomeni bulbari.

1.5.1 La Malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson colpisce di norma individui di età media, intorno ai 50 anni, ed è più comune sopra i 60 anni, ma molti casi sono stati diagnosticati in questi ultimi anni intorno ai 40 anni o anche al di sotto. Infine, risulta lievemente più frequente negli uomini che nelle donne, ed ha una durata media di circa 14-15 anni¹⁵.

La malattia di Parkinson, è comunque solo una delle sindromi parkinsoniane o parkinsonismi. Le sindromi parkinsoniane, costituiscono un vasto capitolo della moderna nosologia neurologica. Si distinguono forme primarie (malattia di

¹⁵ Schoenberg BS, et al. *Prevalence of Parkinson's Disease in the Biracial Population of Copiah County, Mississippi*. Neurology 1985; 35, p. 841-845.

Parkinson, atrofia multisistemica, paralisi sopranucleare progressiva, degenerazione cortico-basale, demenza a corpi di Lewy), secondarie (parkinsonismi cosiddetti vascolari, infettivi, post-infettivi, post-traumatici e da agenti non convenzionali, da tossici ambientali, iatrogeni, metabolici), e forme di parkinsonismo associate a malattie ereditarie del sistema nervoso centrale (morbo di Wilson, variante di Westphal della corea di Huntington, malattia di Hallervorden Spatz)^{16,17}.

Il parkinsonismo, è un termine generico, con il quale si intendono sia la malattia di Parkinson che tutte le sindromi che si manifestano con sintomi simili.

La malattia di Parkinson, è stata descritta per la prima volta da James Parkinson nel 1817, come una malattia neurodegenerativa del Sistema Nervoso Centrale (SNC), riguardante almeno 1% della popolazione con oltre 55 anni di età¹⁸, la cui eziologia a tutt'oggi, non è completamente conosciuta. Si cominciò così ad utilizzare il termine parkinsonismo idiopatico.

1.5.1.1 Fattori eziologici

Fin dai primi anni della sua scoperta, molti autori cercarono, peraltro senza successo, una singola causa della malattia. Recenti osservazioni, suggeriscono una genesi multifattoriale; in particolare, studi epidemiologici indicano, che l'esposizione protratta a una o più cause ambientali e/o occupazionali, possono aumentare il rischio d'insorgenza della malattia^{19,20,21,22,23}. Questi includono, l'esposizione a tossine esogene, quali: pesticidi (Paraquat); metalli (Al, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Zn); altri xenobiotici (es. il monossido di carbonio), e prodotti chimici industriali (MPTP, solventi organici); stile di vita (dieta e fumo); luogo di

¹⁶ Koller WC, Hubble JP. *Classification of parkinsonism*. In: Handbook of Parkinson's disease, WC Koller (ed), Marcel Dekker, Inc. New York. 1992; p. 59-102.

¹⁷ Granieri E. *Epidemiologia del Morbo di Parkinson*. In: Manuale di Neuroepidemiologia Clinica, E Granieri e G Rosati (eds), la Nuova Italia Scientifica, Roma. 1990, p. 183-209.

¹⁸ Rajput AH. *Frequency and cause of Parkinson's disease*. Can. J. Neurol. Sci., 1992; 19, p. 103-107.

¹⁹ Di Monte DA, et al. *Comparative-studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cytotoxicity*. Biochem Biophys Res Commun.; 1986, 137, p. 303-309.

²⁰ Di Monte DA, et al. *Environmental factors in Parkinson's disease*. Neurotoxicology, 2002; 23, p. 487-502.

²¹ Di Monte DA. *The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins?* Lancet Neurol., 2003; 2, p. 531-538.

²² McCormack AL, et al. *Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat*. Neurobiol Dis., 2002; 10, p. 119-127.

²³ Tanner CM, Ben-Shlomo Y. *Epidemiology of Parkinson's disease*. Adv Neurol., 1999; 80, p. 153-159.

residenza (ambiente rurale) e attività professionale (lavoro agricolo)²⁴; così come una predisposizione individuale, determinata da una disfunzione mitocondriale e danno ossidativo (ROS).

Però molti studi, mostrano una correlazione positiva fra il Parkinson, e l'esposizione sia acuta che cronica a pesticidi^{25,26}, in particolare per i prodotti chimici utilizzati come erbicidi, quali il paraquat, il diquat ed il rotenone. L'esposizione a erbicidi, insetticidi e fungicidi, avviene attraverso l'assunzione di acqua e cibo contaminato, per contatto cutaneo o attraverso l'inalazione diretta^{27,28}.

Questa tesi, è sostenuta attraverso una scoperta effettuata nel 1984 da Langston e colleghi, a seguito di una epidemia di parkinsonismi, osservata agli inizi degli anni ottanta, in una comunità di tossicodipendenti del Nord California^{29,30}, ma anche nella scimmia^{31,32}, una sindrome neurologica del tutto sovrapponibile a quella tipica del MP.

Questa epidemia, ha permesso di identificare la più potente tossina parkinsonigena attualmente conosciuta, l'MPTP (1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidropiridina). Questa sostanza, prodotta in laboratorio, era presente come contaminante nelle dosi di eroina, vendute per alcuni mesi in California, ed ha una somiglianza strutturale con uno dei più diffusi erbicidi, il paraquat. Questa osservazione ha spinto la comunità scientifica, ad indagare il ruolo

²⁴ Lai BCL, et al. *Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease*. Parkinson's Rel Dis, 2002; 8, p. 297-309.

²⁵ Jiménez-Jiménez FJ, et al. *Exposure to well water and pesticides in Parkinson's disease: a case control study in the Madrid area*. Movement Disord 1992; 7(2), p. 149-152.

²⁶ Gorell JM, et al. *The risk of Parkinson's disease with exposure to the pesticides, farming, well water and rural living*. Neurology 1998; 50(5), p. 1346-1350.

²⁷ Marder K, et al. *Environmental risk factors for Parkinson's disease in an urban multiethnic community*. Neurology. 1998; 50(1), p. 279-281.

²⁸ Vanacore N, et al. *Evaluation of risk of Parkinson's disease in a cohort of licensed pesticide users*. Neurol Sci., 2002; 23(Suppl 2), p. S119-S120.

²⁹ Davis GC, et al. *Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues*. Psychiatry Res., 1979; 1(3), p. 249-254.

³⁰ Langston JW, et al. *Chronic parkinsonism in humans due to a product of meripidine-analog synthesis*. Science, 1983; 219(4587), p. 979-980.

³¹ Burns RS, et al. *A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1983; 80(14), p. 4546-4550.

³² Langston JW, et al. *Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey*. Brain Res., 1984; 292(2), p. 390-394.

dell'esposizione occupazionale a pesticidi, nell'eziopatogenesi della malattia di Parkinson. Oggi, dopo venti anni di osservazioni epidemiologiche, si può stimare che un soggetto professionalmente esposto a pesticidi, ha un rischio all'incirca doppio, di presentare in età avanzata la malattia di Parkinson, rispetto a chi non è stato esposto a queste sostanze (OR = 1,85; IC 95% = 1,31-2,60)³³.

Purtroppo, anche se in questo caso è apparsa chiaramente, la relazione tra una sostanza neurotossica e il successivo sviluppo del parkinsonismo, non sono state ancora chiarite l'etiologia e la patogenesi, della forma classica della malattia. Si può soltanto supporre che sostanze simili alla MPTP, agiscano come tossine, provocando la morte delle cellule della sostanza nera, e la successiva comparsa della malattia.

L'associazione tra il Parkinson, il luogo di residenza e/o l'attività professionale è spesso considerata il risultato dell'esposizione a vari composti chimici usati in agricoltura³⁴; infatti, gli agricoltori e le persone che vivono in ambienti rurali in generale, sono stati trovati esposti a vari pesticidi a livelli più alti del normale^{35,36}. Metzler, ad esempio, suggerisce una dipendenza tra il Parkinson e l'ingestione di pesticidi, rilasciati dal suolo nell'acqua potabile³⁷.

È stato suggerito che le differenti abitudini alimentari possono influire sulla variabilità geografica del Parkinson. L'assunzione di cibi ricchi di grassi animali, sia saturi che insaturi³⁸ e di vitamina D, incidono positivamente sullo sviluppo della malattia³⁹. Mentre l'assunzione di frutta, verdura, pane, carne o cibi contenenti le vitamine A, C ed E, non è correlata in alcun modo col Parkinson.

³³ Gorell JM, et al. *The risk of Parkinson's disease with exposure to the pesticides, farming, well water and rural living*. Neurology 1998; 50(5), p. 1346-1350.

³⁴ Firestone JA, et al. *Pesticides and risk of Parkinson disease: a population-based case-control study*. Arch Neurol., 2005; 62(1), p. 91-95.

³⁵ Hubble JP, et al. *Risk factors for Parkinson's Disease*. Neurology, 1993; 43(9), p. 1693-1697.

³⁶ Liou HH, et al. *Environmental risk factors for Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan*. Neurology, 1997; 48(6), p. 1583-1588.

³⁷ Metzler DF. *Health implications of organics in groundwater*. Am J Public Health, 1982; 72(12), p. 1323-1324.

³⁸ Johnson CC, et al. *Adult nutrient intake as a risk factor for Parkinson's disease*. Int J Epidemiol, 1999; 28(6), p. 1102-1109.

³⁹ Anderson C, et al. *Dietary factors in Parkinson's disease: the role of food groups and specific foods*. Mov Disord, 1999; 14(1), p. 21-27.

Altri alimenti, quali noci⁴⁰, legumi⁴¹, patate⁴² e caffè⁴³ sembrano svolgere, invece, un ruolo protettivo.

Vi sono inoltre correlazioni che ancora attendono risposte precise, quali il basso numero di ipertesi tra i malati di Parkinson, o l'alta frequenza di traumi cranici, e di soggetti che eseguono una dieta povera di verdure⁴⁴. Singolare e curiosa appare inoltre, la bassa percentuale di fumatori tra i malati di Parkinson, come se il fumo di sigaretta esercitasse un'azione protettiva. Nessuna responsabilità va attribuita all'alcool, in quanto il consumo di alcolici nei malati di Parkinson, è uguale a quello riscontrato in soggetti normali.

Alcuni studi suggeriscono un'associazione della malattia di Parkinson, a lesioni cerebrali, in particolare traumi accompagnati da emorragia; tuttavia non è ancora definitivamente accertato che il trauma possa essere considerato un fattore eziologico⁴⁵.

1.5.1.2 Quadro sintomatologico

La patologia è caratterizzata dalla progressiva degenerazione della connessione neurale tra la Substantia Nigra e lo striato, due porzioni queste del cervello, essenziali per il mantenimento della normale funzione motoria dell'organismo⁴⁶.

La maggior parte degli studi hanno utilizzato i criteri diagnostici previsti da Schoenberg e coll.⁴⁷ che fondano la diagnosi di parkinsonismo, tenendo in

⁴⁰ Fall PA, et al. *Nutritional and occupational factors influencing the risk of Parkinson's disease: a case-control study in southeastern Sweden*. *Mov Disord* 1999; 14(1), p. 28-37.

⁴¹ Morens DM, et al. *Case-control study of idiopathic Parkinson's disease and dietary vitamin E intake*. *Neurology*, 1996; 46(5), p. 1270-1274.

⁴² Hellenbrand W, et al. *Diet and Parkinson's disease. I: a possible role of the past intake of specific foods and food groups. Results from a self-administered food-frequency questionnaire in a case control study*. *Neurology*, 1996; 47(3), p. 636-643.

⁴³ Benedetti MD, et al. *Smoking, alcohol and coffee consumption preceding Parkinson's disease: a case-control study*. *Neurology*, 2000; 55(9), p. 1350-1358.

⁴⁴ Taylor CA, et al. *Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study*. *Am J Med Genet.*, 1999; 88(6), p. 742-749.

⁴⁵ Landrigan PJ, et al. *Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life*. *Environ Health Perspect*, 2005, 113 (9), p. 1230-1233.

⁴⁶ Wooten GF. *Neurochemistry and neuropharmacology of Parkinson's disease*. 1997. In: *Movement disorders: neurologic principles and practice*. Watts RL, Koller W, Ed. New York: McGraw-Hill, p. 153-160.

⁴⁷ Schoenberg BS, et al. *Prevalence of Parkinson's disease in the Biracial Population of Copiah County, Mississippi*. *Neurology*, 1985; 35(6), p. 841-845.

considerazione quattro sintomi cosiddetti cardinali: tremore a riposo, bradicinesia, rigidità, instabilità posturale.

Il Parkinson (le cui cause sono ancora ignote) è caratterizzato dalla degenerazione di neuroni di alcuni gangli (locus coeruleus e substantia nigra), presenti alla base del cervello, e nella parte interessata si ha la diminuzione della concentrazione del neurotrasmettitore chiamato dopamina; in tal modo, la trasmissione degli impulsi nervosi viene alterata.

Le cellule nervose della sostanza nera, infatti, producono un neurotrasmettitore, cioè una sostanza chimica che trasmette messaggi a neuroni, in altre zone del cervello. Il neurotrasmettitore in questione, chiamato appunto dopamina, è responsabile dell'attivazione di un circuito che controlla il movimento. I sintomi possono comparire a qualsiasi età, anche se un esordio prima dei 40 anni è insolito, e prima dei 20 è estremamente raro. Nella maggioranza dei casi, i primi sintomi si notano intorno ai 60 anni. Il motivo per il quale questi neuroni rimpiccioliscono e poi muoiono non è ancora conosciuto ed è tutt'ora argomento di ricerca.

A questi, si associano disturbi di equilibrio, atteggiamento curvo, impaccio dell'andatura, e molti altri sintomi definiti secondari, perché sono meno specifici, e non sono determinanti per porre una diagnosi. All'inizio, i soggetti riferiscono una sensazione di debolezza, di impaccio nell'esecuzione di movimenti consueti, che riescono comunque a compiere, stancandosi però più facilmente, in genere non si associa una sensazione di perdita di forza muscolare. Ci si accorge poi di una maggior difficoltà, a cominciare nonché a portare a termine, i movimenti alla stessa velocità di prima, come se gli arti interessati fossero "legati", rigidi.

Il *tremore*, sintomo tipicamente associato a questa malattia, compare nel 70% dei casi. Si verifica, tipicamente, in condizioni di riposo e in una mano; ad esempio, quando la mano è abbandonata in grembo oppure se lasciata pendere lungo il corpo.

Solo in tempi lunghi, mesi o anni, può colpire entrambe le mani e, più raramente, uno o entrambi i piedi; si localizza poi alla mandibola e alle labbra, e talvolta a collo e testa. Il tremore scompare, quando il paziente compie un movimento finalizzato, come afferrare un oggetto, per ripresentarsi nella successiva fase di

riposo; in alcuni casi, comunque, esiste anche un “tremore di azione”, che risulta disturbante per lo svolgimento delle attività quotidiane; può verificarsi anche un “tremore interno” che, pur se non avvertito dall’esterno, rappresenta per il malato, una sensazione assai fastidiosa.

Non è però, un sintomo indispensabile per la diagnosi di Parkinson, infatti non tutti i pazienti affetti sperimentano tremore e, d’altra parte non tutti i tremori, identificano una malattia di Parkinson.

La *rigidità* nel Parkinson è causata da un aumento del tono muscolare, di tutti i gruppi muscolari, sia flessori che estensori, e riduce l’escursione dei movimenti, particolarmente degli arti e del tronco.

Nelle fasi più avanzate della malattia, l’*acinesia* interferisce in maniera significativa con le normali attività della vita quotidiana, come: l’alzarsi dalla sedia, vestirsi, lavarsi, ecc... Anche il volto è generalmente interessato (*ipomimia*), così come la voce (*ipofonia*).

Inoltre i parkinsoniani, procedono a passi brevi e veloci, mantenendo il capo flesso, per compensare la sensazione di caduta in avanti. La *bradicinesia*, riguarda i movimenti che richiedono una manualità fine e che, a causa della malattia, divengono sempre più lenti e impacciati. La lentezza colpisce anche l’articolazione del linguaggio, che si fa difficoltosa e monotona (*bradilalia*), come anche la capacità di scrivere, per cui la calligrafia diviene incerta e minuta (*micrografia*), e la mimica facciale, diventa più limitata.

Disturbi secondari, connessi ai sintomi principali, o anche ai farmaci assunti per contrastare il Parkinson, possono comprendere: scialorrea (eccesso di saliva dovuto a scarsa deglutizione); diminuzione di peso; disturbi della funzione urinaria (come l’eccessiva frequenza delle minzioni); crampi muscolari agli arti (*distonie*); alterazione della sudorazione; disturbi dell’umore (depressione nella metà dei soggetti) e del sonno. Circa il 40% dei malati, lamenta a uno stadio di Parkinson avanzato, anche stati confusionali e forme di demenza che non raggiungono mai la gravità degli analoghi sintomi dell’Alzheimer. L’instabilità posturale, è probabilmente il sintomo più disabilitante.

La perdita dei riflessi posturali, avviene precocemente nel corso della malattia, ma diventa disabilitante solo nelle fasi avanzate, quando il paziente perde la capacità

di correggere la propria postura rapidamente, e la tendenza alle cadute, comincia a diventare più evidente. Talvolta, le cadute possono comparire in concomitanza con gravi discinesie nei soggetti con malattia avanzata.

Il *freezing*, è un sintomo, caratterizzato dall'incapacità di iniziare la marcia e l'interruzione della stessa, quando il paziente viene distratto, attraversa passaggi stretti o deve cambiare il senso di marcia. Il *freezing* della marcia, è la forma più frequente, e può manifestarsi all'inizio e/o durante la stessa, sia nel cambiamento di direzione che quando s'incontra un ostacolo. Il paziente riferisce di sentirsi i piedi come "incollati" al terreno: il fenomeno è improvviso e sempre transitorio, ma può giungere a determinare il blocco completo della deambulazione. Talora, invece, una volta in marcia, il cammino diviene inarrestabile per una liberazione paradossa degli automatismi del cammino: questo è il fenomeno della ipercinesia paradossa, che compare in genere in concomitanza di particolari stati affettivo – emotivi. Nelle fasi più avanzate, anche la scrittura e la voce possono essere colpite da alterazioni tipo *freezing*.

Durante il decorso della malattia i sintomi peggiorano, anche se il trattamento con i nuovi farmaci, hanno notevolmente migliorato la qualità di vita dei soggetti.

Attualmente non si conosce una cura per la malattia di Parkinson; tuttavia esistono diversi trattamenti che possono controllarne i sintomi.

Le cure oggi disponibili, sono di aiuto nel controllo dei sintomi della malattia, ma non ne arrestano lo sviluppo. E gli studi si concentrano sulla ricerca delle cause della malattia, sulla prevenzione, e sul miglioramento delle terapie.

1.5.1.3 Prospettive

La ricerca sul trattamento del Parkinson, è focalizzata su due filoni: il rallentamento della degenerazione del tessuto cerebrale (neuroprotezione), e la possibilità di ripristinare le funzioni perse.

Tra i composti sperimentati per la possibile azione neuroprotettiva, vi sono quelli che potenziano l'azione di un potente antiossidante, il glutathione; quelli che agiscono contro i radicali liberi, molecole responsabili di fenomeni ossidativi cellulari; ancora, quelli che agiscono contro la funzione ossidativa della dopamina, e quelli che eliminano gli eccessi di ferro (elemento ossidante e perciò dannoso se non legato ad altri composti).

Se non è stato ancora trovato il farmaco definitivo anti-Parkinson, un agente protettivo dalla potente azione ritardante nei confronti della degenerazione neurologica, sembra essere un enzima, il cosiddetto Q10. Ciò è quanto emerge dai risultati di uno studio triennale, condotto dal medico statunitense Clifford Shults all'Università di San Diego (California), resi noti nell'ottobre 2002⁴⁸. La molecola, è già presente fisiologicamente nell'organismo umano, e risiede nei mitocondri, dove svolge un'azione antiossidante e inibisce la sintesi di radicali liberi, assai dannosi per la cellula, si trova anche in molti integratori alimentari in commercio. Lo studio del team californiano, si è basato sull'osservazione che molti soggetti parkinsoniani, possiedono livelli insolitamente bassi di enzima Q10; ciò potrebbe essere correlato al processo degenerativo. Questi risultati di Shults, hanno suscitato molto interesse nella comunità scientifica, ma anche perplessità, determinate dal fatto che la sua ricerca, ha misurato il rallentamento della malattia nei soggetti, attraverso la valutazione dei sintomi visibili, mentre non ha potuto fornire dati certi, sulla reale condizione neurologica dei malati; dunque l'enzima potrebbe secondo alcuni, alleviare solo i sintomi. I National Institutes of Health statunitensi, stanno valutando l'ipotesi di sottoporre questa molecola e altre, come i farmaci antinfiammatori, a trials clinici su ampia scala.

⁴⁸ Shults CW, et al. *Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline*. Arch Neurol., 2002; 59(10), p. 1541-1550.

CAPITOLO 2

SOSTANZE NEUROTOSSICHE

Negli ultimi decenni, stiamo assistendo ad un sostanziale cambiamento degli ambienti di lavoro e di vita. Se da un lato, infatti, le esposizioni professionali sono state notevolmente ridotte, grazie ad efficaci misure di prevenzione, l'esposizione ambientale, che, quindi coinvolge tutta la popolazione, è drammaticamente cambiata con un aumento delle concentrazioni dei composti chimici disponibili.

2.1 Neurotossicità

Neurotossiche sono tutte quelle sostanze nocive che hanno come organo "bersaglio" il sistema nervoso.

Questo complesso sistema è controllato e coordinato da processi neuronali che vedono coinvolti neurotrasmettitori, recettori biochimici, ormoni, e a tal proposito risulta essere particolarmente vulnerabile alle sostanze tossiche, per diverse peculiarità. Le cellule costituenti il sistema nervoso sono per loro natura soggette ad una progressiva degenerazione legata al ciclo di vita dell'individuo, ma tale degenerazione può essere incrementata e accelerata da danni indotti da esposizione a composti tossici.

Alcune regioni del cervello, nonché alcune cellule neuronali, sono direttamente esposte a sostanze chimiche, grazie ad una capillare irrorazione sanguigna, e alla possibilità per alcuni composti, a causa della loro affinità per i lipidi, di superare facilmente la barriera ematoencefalica.

Gli effetti tossici sul sistema nervoso comprendono principalmente l'alterazione del bilanciamento ionico, l'interferenza con i neurotrasmettitori chimici o con i loro recettori e l'anossia, cioè la mancanza di ossigeno a livello cellulare. Le cellule nervose hanno infatti un'elevata velocità metabolica, e per questo richiedono un maggior apporto di ossigeno, rispetto alle altre cellule del corpo. Dato che un apporto adeguato di ossigeno è essenziale per l'appropriato funzionamento del cervello, ogni sostanza che compromette il flusso del sangue al cervello, può causare dei seri danni.

Quindi la tossicità, si può manifestare sia a livello generale del cervello, che sulle singole fibre nervose, sulle guaine mieliniche ecc..

In definitiva, le sostanze neurotossiche possono essere classificate sulla base dei loro siti target, secondo lo schema di Spencer e Schaumburg¹, in cui viene presa in considerazione solo l'azione diretta sul sistema nervoso, mentre sono omessi effetti su altri sistemi che possono indirettamente avere conseguenze sul sistema nervoso centrale come, ad esempio, il danneggiamento di cellule del sistema immunitario

2.2 Inquinanti chimici

In ambito tossicologico, la valutazione dei fattori di rischio rappresenta un nuovo campo di studio piuttosto complesso, considerando che sia a livello ambientale che occupazionale, raramente un individuo è esposto ad un unico agente, bensì ad una miscela di composti che può variare nella composizione e nella concentrazione, in una dinamica temporale piuttosto ampia. Inoltre, gli effetti indotti sulla salute umana in seguito ad esposizione sono manifestazione di una realtà individuale più complessa, rappresentata da un assetto genetico, uno stato di salute pregresso o corrente, uno stato socio-economico, fisiologico, stili di vita, strettamente individuali. Questi fattori possono infatti interferire, aumentando o riducendo il rischio, e possono evolversi durante la vita dell'individuo. Tutto ciò, pone la necessità di una criticità sui modelli di studio e sui risultati ottenuti, perché nella maggior parte dei casi non si è in grado di contemplare tutto lo spettro di possibili fattori che contribuiscono al rischio².

Il concetto di dose di esposizione è strettamente correlata al tempo, alla concentrazione assorbita dall'organismo, alla capacità della sostanza di raggiungere il sistema nervoso centrale, la via di esposizione, nonché la potenzialità dei composti di dar luogo ad effetti additivi, sinergici, o antagonisti³.

¹ Spencer PS, Schaumburg HH. *An expanded classification of neurotoxic responses based on cellular targets of chemical agents*. Acta Neurol Scand. Suppl., 1984, 100, p. 9-19.

² Cory-Slechta DA, et al. *Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype*. Environ Health Perspect., 2005; 113(9), p. 1263-1270.

³ Caban-Holt A, et al. *Neurodegenerative memory disorders: a potential role of environmental toxins*. Neurol Clin., 2005; 23(2), p. 485-521.

2.2.1 Sostanze chimiche neurotossiche

Tra i primi composti ad essere stati studiati come sostanze neurotossiche, troviamo:

a) MPTP

L'MPTP (*1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidro-piridina*) è un composto secondario che si forma durante la sintesi della meperidina. Questo composto, nel 1980, è stato oggetto dei primi studi riportati in letteratura, in riferimento a manifestazioni cliniche simili al morbo di Parkinson, in un gruppo di tossicodipendenti che avevano fatto uso di eroina di sintesi contaminata da MPTP (*1-metil-4-fenil 1,2,3,6-tetraidropiridina*)⁴. L'MPTP non è tossico di per sé, ma lo diviene quando viene metabolizzato a ione MPP⁺ (*1-metil 4-fenilpiridinico*). In particolare, l'MPPP (*1-metil 4-fenil 4-propionoxy-piridina*), è un farmaco oppioide analgesico, sviluppato nel 1940 dai ricercatori della “Hoffmann – La Roche”. Successivamente, il farmaco fu sintetizzato nel 1977 per scopi ricreativi, da uno studente universitario americano “Berry Kidston”, il quale invertendo l'estere della meperidina produceva una sostanza potenzialmente simile alla morfina. Alcuni giorni dopo aver provato questa nuova sostanza fatta in casa, Kidston sviluppò i sintomi tipici di una grave malattia di Parkinson, così come anche alcuni suoi amici che avevano condiviso con lui la sostanza stupefacente.

Quindi l'MPTP, non è usato nella pratica clinica, ma è stato illecitamente fabbricato, al fine della produzione di droghe da abuso. Si tratta di un analogico alla meperidina (nome commerciale Demerol), usato nel XX secolo come forte analgesico, vendibile solo dietro prescrizione medica.

L'MPTP passa facilmente la barriera emato-encefalica, entra nelle cellule gliali dove le MAO-B (monoamino ossidasi- B) lo ossidano in MPP⁺. L'MPP⁺ (*1-metil 4-fenil-piridina*) entra nelle cellule dopaminergiche della substantia nigra, sfruttando il carrier della dopamina, e provocando la morte del neurone. L'MPTP inibisce la respirazione mitocondriale ed inoltre provoca uno stress ossidativo che genera ulteriore danno, provocando la rapida insorgenza dei sintomi irreversibili

⁴ Langston JW, et al. *Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure*. Ann Neurol., 1999; 46(4), p. 598–605.

tipici del Parkinson. L'MPP+ clorito è utilizzato come erbicida, con il nome di Cyperquat, un composto analogo del Paraquat⁵.

b) Pesticidi

I pesticidi rappresentano un insieme di sostanze comunemente utilizzate per controllare il proliferare di insetti, semi e funghi. Essi sono classificati sulla base dell'organismo target o del loro utilizzo come insetticidi, erbicidi, fungicidi o fumiganti. Gli insetticidi, a loro volta, vengono subclassificati sulla base della tipologia chimica, come organofosfati, organoclorurati, carbammati e piretroidi. L'esposizione può avvenire a vari livelli occupazionali, per contaminazione di cibi e di acque, e perciò la loro tossicità viene espletata su un ampio numero di individui e in diverse fasce di età. È frequente la possibilità che l'esposizione avvenga con miscele di composti strutturalmente simili, per cui è difficile ricondurre gli effetti ad un unico agente.

I bambini, in questo contesto, rappresentano gli individui più facilmente esposti, perfino a livello fetale, nel caso di lavoratrici esposte durante la gravidanza. Inoltre, i bambini presentano la peculiarità di essere più suscettibili ad effetti tossici rispetto ad un individuo adulto, perché assorbono dosi maggiori di composto, in rapporto al loro peso corporeo, e hanno un metabolismo e un'escrezione efficienti.

Studi di meta-analisi hanno confermato che esposizioni cumulative a pesticidi per assunzione di cibi contaminati, o per stili di vita o lavoro aumentano il rischio di sviluppo del morbo di Parkinson^{6,7,8}.

⇒ **Paraquat e Parkinson:** il Paraquat (1,1-dimetil 4,4-bipiridinio dicloruro)^{9,10} ha una struttura chimica simile a quella del MPP+, il metabolita attivo del

⁵ Langston JW, et al. *Chronic parkinsonism in humans due to a product of meripidine-analog synthesis*. Science, 1983; 219(4587), p. 979-980.

⁶ Priyadarshi A, et al. *Environmental risk factors and Parkinson's disease: a meta-analysis*. Environ Res., 2001; 86(2), p. 122-127.

⁷ Liou HH, et al. *Environmental risk factors for Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan*. Neurology, 1997; 48(6), p. 1583-1588.

⁸ Liu B, et al. *Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation*. Environ Health Perspect., 2003; 111(8), p. 1065-1073.

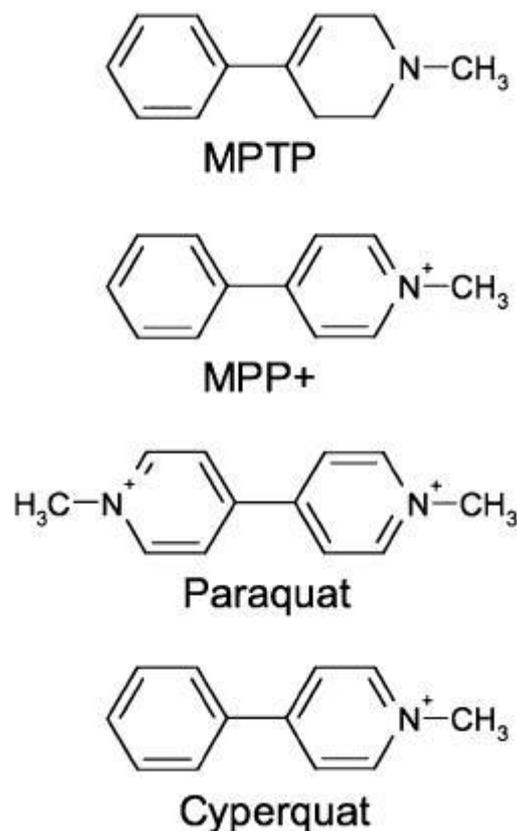
⁹ Brooks AI, Chadwick CA, Gelbard HA, Cory-Slechta DA, Federoff HJ. *Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss*. Brain Res., 1999; 823(1-2), p. 1-10.

¹⁰ McCormack AL, et al. *Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat*. Neurobiol Dis., 2002; 10, p. 119-127.

MPTP. Studi epidemiologici, suggeriscono una relazione dose-effetto positiva, tra l'esposizione cumulativa durante la vita al paraquat ed il rischio di sviluppare il Parkinson¹¹. Studi sperimentali su animali, hanno confermato tale ipotesi, in quanto, somministrando il paraquat si è osservata la perdita per apoptosi di neuroni dopaminergici della sostanza nigra, del sistema nervoso centrale (SNC).

Il paraquat danneggia le cellule attraverso la produzione di stress ossidativo e il danneggiamento mitocondriale. Sia lo stress ossidativo che il danneggiamento mitocondriale rappresentano dei markers della degenerazione dei neuroni in malattie, quali Parkinson, Alzheimer e SLA. Lo stress ossidativo e il malfunzionamento dei mitocondri genera un circolo vizioso, ed è spesso difficile determinare quale sia la causa principale del danneggiamento.

Figura: Struttura delle sostanze chimiche MPTP, MPP+, Paraquat e Cyperquat¹².



¹¹ Liou HH, et al. *Environmental risk factors for Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan*. Neurology, 1997; 48(6), p. 1583-1588.

¹² Miller GW. *Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research*. Toxicol Sci., 2007; 100(1), p. 1-2.

- ⇒ **Maneb e Parkinson:** l'esposizione al ditiocarbammato fungicida "maneb" potenzia la neurotossicità dell' MPTP e del paraquat. Infatti, studi sperimentali su animali esposti ad una **combinazione di paraquat e maneb** hanno mostrato effetti distruttivi sul sistema nigrostriatale, **più severi di quelli prodotti da i singoli agenti**. Inoltre questi effetti sono amplificati con l'invecchiamento^{13,14}.
- ⇒ **Rotenone e Parkinson:** l'insetticida rotenone induce nei topi alterazioni cliniche e neuropatologiche simili a quelli del Parkinson, includendo la degenerazione selettiva del sistema nigrostriatale dopaminergico^{15,16}. Effetti sinergici sono stati osservati in animali esposti ad una combinazione di rotenone e lipopolisaccaride, una molecola che stimola l'infiammazione^{17,18}. In pratica, la microglia è stata implicata nella neurotossicità del rotenone, dal momento che le cellule possono rilasciare sostanze ossigeno reattive (ROS), induttori a loro volta di infiammazione¹⁹.
- ⇒ **Manganese e Parkinson:** anche se il manganese in tracce è essenziale per l'uomo, l'esposizione professionale e cronica ad alti livelli di questo metallo provoca l'accumulazione nei gangli basali, dando luogo a manganismo, una condizione caratterizzata da tremori, rigidità e psicosi²⁰. Questa condizione è stata riscontrata nei minatori di manganese. Preoccupazione esiste con l'introduzione nel mercato dell'additivo metilciclopentadienil-manganese-

¹³ McCormack AL, et al. *Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat*. Neurobiol Dis., 2002; 10, p. 119–127.

¹⁴ Thiruchelvam M, et al. *Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease?* Brain Res., 2000; 873(2), p. 225–234.

¹⁵ Liu B, et al. *Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation*. Environ Health Perspect., 2003; 111(8), p. 1065–1073.

¹⁶ Sherer TB, et al. *Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation*. Exp Neurol., 2003; 179(1), p. 9–16.

¹⁷ Gao HM, et al. *Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease*. J Neurosci., 2003; 23(4), p. 1228–1236.

¹⁸ Thiruchelvam M, et al. *The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease*. J Neurosci., 2000; 20(24), p. 9207–9214.

¹⁹ Liu B, Hong JS. *Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention*. J Pharmacol Exp Ther., 2003; 304(1), p. 1–7.

²⁰ Mergler D, Baldwin M. *Early manifestations of manganese neurotoxicity in humans: an update*. Environ Res., 1997; 73(1-2), p. 92-100.

tricarbonile (MMT) contenente manganese nei combustibili, americani che può aumentare l'esposizione della popolazione al manganese, e quindi il rischio di parkinsonismo²¹.

⇒ **Altre sostanze chimiche e Parkinson:** l'esposizione ad altri composti organici è molto diffusa nella popolazione americana. Livelli elevati di organoclorine sono stati trovati nei cervelli di persone con Parkinson²². Uno studio su individui anziani francesi trovò un'associazione tra l'esposizione professionale pregressa ai pesticidi, una bassa performance cognitiva ed un aumentato rischio di sviluppare l'Alzheimer o il Parkinson^{23,24}. Studi epidemiologici, hanno messo in evidenza, relazioni protettive tra il fumo di sigaretta, consumo di caffè e il Parkinson²⁵.

⇒ **Infiammazione e Parkinson:** l'infiammazione del cervello nelle fasi iniziali della vita, causata dall'esposizione ad agenti infettivi, tossici o fattori ambientali, sono stati suggeriti come una possibile causa o contributo, allo sviluppo in tarda età di Parkinson²⁶. Il processo infiammatorio in alcuni casi, può comportare l'attivazione nel cervello di cellule immuni (microglia ed astrociti), i quali rilasciano fattori infiammatori e neurotossici, con lo scopo di produrre neurodegenerazione²⁷.

⇒ **Infezione e Parkinson:** più recentemente, l'infezione con certi microrganismi, così come il batterio del terreno "Nocardia asteroides", è stato proposto come un fattore di rischio per il Parkinson²⁸. In esperimenti animali,

²¹ Needleman HL, et al. *The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. An 11-year follow-up report.* N Engl J Med., 1990; 322 (2), p. 83-88.

²² Fleming L, et al. *Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides.* Ann Neurol., 1994; 36(1), p. 100-103.

²³ Baldi I, et al. *Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly.* Am J Epidemiol., 2003; 157(5), p. 409-414.

²⁴ Liou HH, et al. *Environmental risk factors for Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan.* Neurology, 1997; 48(6), p. 1583-1588.

²⁵ Hernán MA, Takkouche B, Caamaño-Isorna F, Gestal-Otero JJ. *A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease.* Ann Neurol., 2002; 52 (3), p. 276-284.

²⁶ Liu B, et al. *Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation.* Environ Health Perspect., 2003; 111(8), p. 1065-1073.

²⁷ Liu B, Hong JS. *Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention.* J Pharmacol Exp Ther., 2003; 304(1), p. 1-7.

²⁸ Kohbata S, Beaman BL. *L-dopa-responsive movement disorder caused by Nocardia asteroides localized in the brains of mice.* Infect Immun., 1991; 59(1), p. 181-191.

l'esposizione al batterio endotossina lipopolisaccaride in utero, indusse una neurodegenerazione dopaminergica^{29,30,31}.

⇒ **Isolate popolazioni, ad alto rischio di Parkinson:** nel Parkinson, il tasso di incidenza e mortalità differiscono fra gruppi etnici, rivelando una forte varianza regionale, e queste evidenze aggiuntive provvedono a che i fattori ambientali, possono essere coinvolti in causalità^{32,33}. Per esempio, la popolazione Chamorros di Guam e Rota, nel Pacifico Occidentale, hanno una inusuale alta prevalenza di malattia ai motoneuroni, una sindrome che include la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), Parkinson e demenza progressiva. È stato proposto che questa sindrome di parkinsonismo-demenza, è riferita al consumo di farina fatta da semi di cycad³⁴ o all'inalazione di pollini da pianta di cycad³⁵. Il consumo di farina di cycad, può essere stata comune, specialmente nell'isola di Guam negli anni di carestia, durante la prima e seconda guerra mondiale. Il declino dell'incidenza e l'incremento dell'età all'assalto della SLA e parkinsonismo/demenza complessa, fra il Chamorros oltre 50 anni fa, con il decremento della prevalenza di SLA, oltre lo stesso tempo in aree con alte incidenze di Giappone ed Indonesia, suggerisce la scomparsa di un unico fattore ambientale di questi gruppi di popolazione^{36,37}.

²⁹ Gao HM, et al. *Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease*. J Neurochem., 2002; 81(6), p. 1285-1297.

³⁰ Liu B, et al. *Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation*. J Pharmacol Exp Ther., 2000; 293(2), p. 607-617.

³¹ Liu B, et al. *Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation*. Environ Health Perspect., 2003; 111(8), p. 1065-1073.

³² Ben-Shlomo Y. *The epidemiology of Parkinson's disease*. Baillieres Clin Neurol., 1997; 6(1), p. 55-68.

³³ Foster HD. *Why the preeminent risk factor in sporadic Alzheimer's disease cannot be genetic*. Med Hypotheses, 2002; 59(1), p. 57-61.

³⁴ Spencer PS. *Food toxins, ampa receptors, and motor neuron diseases*. Drug Metab Rev., 1999; 31(3), p. 561-587.

³⁵ Seawright AA. *Directly toxic effects of plant chemicals which may occur in human and animal foods*. Nat Toxins., 1995; 3(4), p. 227-232.

³⁶ Kurland LT, Mulder DW. *Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geographic distribution and special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations*. Neurology, 1954; 4(5), p. 355-378; 4(6), p. 438-448.

³⁷ Plato CC, et al. *Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam: changing incidence rates during the past 60 years*. Am J Epidemiol., 2003; 157(2), p. 149-157.

2.2.2 L'esposizione ai pesticidi aumenta il rischio di Parkinson

Diversi studi, rilevano come il mix di “paraquat” e “maneb”, aumentino da quattro a sei volte la comparsa della malattia di Parkinson fra agricoltori e popolazioni rurali. Il terreno fertile dell'area californiana della Central Valley, è famosa come una delle maggiori aree al mondo, per gli opulenti raccolti; a lungo le colture sono state protette da insetti, erbacce e funghi da erbicidi, come il “paraquat”, e fungicidi come il “maneb”. Ora gli scienziati, sono stati in grado di collegare l'uso di questi pesticidi, a processi neurodegenerativi che innescano processi che conducono alla malattia di Parkinson³⁸. Per natura un erbicida (il paraquat), protegge le colture, controllando un'ampia gamma di erbe infestanti annuali e alcune perenni (erbacce) che riducono sia la resa, sia la qualità delle colture, entrando in concorrenza con la coltura principale per l'apporto idrico, di sostanze nutritive e di luce. Il paraquat, è uno degli erbicidi più diffusi al mondo, e viene usato per controllare le erbe infestanti annuali e perenni, in una gamma estesa di colture. Le caratteristiche principali che distinguono il paraquat, erbicida non selettivo di contatto, dagli altri principi attivi, utilizzati per la protezione delle colture, sono:

- a) il paraquat è “non selettivo”, in altre parole, elimina una gamma estesa di erbacce annuali e gli apici delle piante perenni insediate;
- b) l'azione del paraquat, è rapidissima;
- c) il paraquat è resistente alla pioggia, entro pochi minuti dall'applicazione;
- d) il paraquat diviene biologicamente inattivo, non appena a contatto con il terreno.

Nel nuovo studio epidemiologico, condotto sui residenti della Central Valley, a cui è stata diagnosticata la malattia di Parkinson, i ricercatori hanno riscontrato che anni di esposizione alla combinazione di questi due pesticidi, ha aumentato il rischio di Parkinson del 75%. Inoltre, per le persone oltre i sessant'anni, e in quelle più giovani, esposte alla combinazione dei pesticidi ha aumentato il rischio della malattia da più di quattro a sei volte (ricerca sull'American Journal of

³⁸ Ritz BR, et al. *Dopamine transporter genetic variants and pesticides in Parkinson's disease*. Environ Health Perspect., 2009; 117(6), p. 964-969.

Epidemiology, partendo da uno studio di 368 residenti con diagnosi di Parkinson e altri 341 come gruppo di controllo).

Si è riscontrato l'aumento di questa malattia, fra agricoltori e residenti delle zone rurali, in questo modo si è scoperto la possibile connessione, contributo e responsabilità dei pesticidi agricoli.

Fino ad ora, i dati sull'esposizione umana ai pesticidi, non è stata disponibile, in gran parte perché è stato troppo difficile misurare i dati sugli individui e l'esposizione ambientale, a tutte le specifiche di antiparassitari. Così alcuni studiosi della University of Southern California, ha sviluppato un sistema di informazione geografica all'esposizione ai pericolosi pesticidi, applicati alle colture agricole. Questo GIS (georeferenziazione del territorio) combinato, usa le mappe di utilizzo dei pesticidi, e la trasmissione dei dati da parte dello Stato della California, si riferisce ai casi di soggetti affetti da Parkinson. Inoltre si avevano a disposizione, dati come la superficie d'uso dei pesticidi, includendo il nome del principio attivo del pesticida, l'importo richiesto, la coltura, il metodo di applicazione. I risultati hanno confermato le osservazioni di due precedenti studi su animali, con la considerazione finale che l'esposizione a più sostanze chimiche può aumentare l'effetto di ciascun prodotto chimico³⁹.

2.3 I pesticidi

2.3.1 Definizioni

I pesticidi, giocano un ruolo importante nella moderna agricoltura, e la loro produzione ed il loro uso, sono in continua crescita. D'altra parte, cresce anche la preoccupazione per i potenziali rischi per la salute di questi composti⁴⁰.

Con il termine di *pesticida* (deriva dalla trasposizione dalla lingua anglosassone del termine «pesticide», letteralmente «killer dei parassiti»), si indica in generale «ogni sostanza o miscela di sostanze utilizzate per prevenire, distruggere, o controllare qualsiasi parassita (organismi che vivono a spese di altri organismi), includendo i vettori responsabili di patologie umane o animali, specie non volute di piante o animali in grado di causare danni durante, o in ogni caso in grado di

³⁹ Costello S, et al. *Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California*. Am J Epidemiol., 2009;169(8), p. 919-926.

⁴⁰ Dich J, et al. *Pesticides and cancer*. Cancer Causes Control. 1997; 8(3), p. 420-443.

interferire con la produzione, la lavorazione, l'immagazzinamento, il trasporto o la vendita di alimenti, materie prime agricole, legni o manufatti in legno, mangimi per animali, o quelle sostanze che possono essere somministrate agli animali per il controllo di insetti, aracnidi, o altri parassiti esterni o interni al loro organismo»⁴¹. Queste sostanze però, danneggiano le piante coltivate, riducendone la produttività dei terreni e la qualità dei raccolti agricoli.

2.3.2 Legislazione

Attualmente, il quadro normativo è molto complesso e sottoposto a costanti modifiche, per la sostituzione delle sostanze ritenute pericolose per la salute dell'ambiente e dell'uomo. Nonostante ciò, vi sono alcuni aspetti poco chiari che riguardano soprattutto alcune sostanze attive pericolose, il cui utilizzo seppur limitato, viene ancora consentito. Inoltre, manca totalmente una regolamentazione specifica, rispetto al simultaneo impiego di più principi attivi nella produzione dei formulati, così come circa la rintracciabilità di più residui, in un singolo prodotto alimentare.

Bisogna riconoscere che molti dei pesticidi oggi in uso, nascono dall'unione di più sostanze attive e tuttavia, la normativa vigente non tiene conto dei rischi legati a questo aspetto.

La prima Legge Italiana che ha introdotto specifiche norme sull'uso dei pesticidi, è stata la Legge n. 283/62: "Disciplina igienica della produzione delle sostanze alimentari e delle bevande". Successivamente fu emanato il D.P.R. n. 1255/68, in cui venivano previste le disposizioni per l'applicazione della Legge n. 283/62, che è stato recentemente abrogato dal D.P.R. n. 290/01.

Anche a livello comunitario la disciplina dei pesticidi, ha assunto nel tempo un rilievo sempre maggiore, al punto che l'Unione Europea ha emanato specifiche direttive di settore. In particolare va ricordata, la Direttiva Comunitaria n. 91/414/CE, (abrogata dal Regolamento (CE) n. 1107/2009), che disciplina le procedure per la registrazione e l'immissione in commercio dei pesticidi.

Il Regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 ottobre 2009, relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari, e che

⁴¹ Maroni M, et al. *Gli antiparassitari: normativa, impieghi e strategie di prevenzione*. In: Foà V, Ambrosi L. Med del Lav., Torino, UTET, II ed., 2003, p. 229-260.

abroga le direttive 79/117/CEE (relativa al divieto di immettere in commercio e impiegare prodotti fitosanitari contenenti determinate sostanze attive) e 91/414/CEE (relativa all'autorizzazione e immissione in commercio dei prodotti fitosanitari) del Consiglio, è entrato in vigore il 14 dicembre 2009, è applicato a far data dal 14 giugno 2011. La nuova normativa comunitaria, regola l'approvazione delle sostanze attive, e stabilisce le norme che disciplinano l'autorizzazione dei prodotti fitosanitari presentati in forma commerciale, nonché l'immissione sul mercato, l'uso e il controllo degli stessi all'interno della Comunità.

Le finalità perseguite, riguardano un ulteriore innalzamento del livello di tutela della salute umana e animale e dell'ambiente, una migliore protezione della produzione agricola, ed il consolidamento del mercato unico dei prodotti fitosanitari.

Stabilisce procedure di autorizzazione armonizzate, tali da:

- garantire un elevato livello di protezione della salute umana, animale e dell'ambiente, salvaguardando la competitività dell'agricoltura;
- migliorare il funzionamento del mercato interno mantenendo lo stesso schema della direttiva 91/914/CEE, basato sul doppio binario:
 - a) approvazione a livello europeo di un elenco positivo di sostanze attive;
 - b) autorizzazione a livello nazionale, dei prodotti fitosanitari contenenti una o più sostanze attive rientranti in tale elenco, nel rispetto del principio di precauzione che ogni Stato membro è libero di applicare.

2.3.3 Usi

Nonostante quanto previsto dalla normativa vigente, circa la corretta definizione di prodotto *fitosanitario*, in questo studio, per una questione di conformità di definizione con molti studi stranieri, si continuerà ad usare il termine *pesticida*.

È generalmente riconosciuta l'utilità dell'impiego dei pesticidi in agricoltura, per migliorare la qualità e la quantità dei raccolti, ma non solo; sono utilizzati anche in ambiti non agricoli come, ad esempio: in attività di manutenzione (diserbanti) delle linee ferroviarie e stradali; in particolari settori industriali, quali l'industria del legno (insetticidi e fungicidi) e della pelle (fungicidi); in sanità pubblica, nella lotta contro i vettori (insetticidi/rodenticidi); ed in ambito domestico e civile.

Rientrano in questa categoria gli insetticidi, i topicidi e i raticidi a uso domestico e civile, gli insetto-repellenti e i disinfettanti germicidi o battericidi⁴².

Il successo che questi prodotti hanno sempre avuto, va ricercato nella semplicità di impiego, nella relativa economicità degli interventi, e nella efficacia degli stessi. Allo stato attuale della ricerca, le metodologie di lotta alternativa (biologica e biotecnologica), presentano ancora rilevanti difficoltà di applicazione, sia per la loro natura più complessa che per la reticenza ad attuarle, perché ritenute poco sicure, dal punto di vista dell'efficacia di combattere le avversità.

L'uso attuale dei pesticidi, differisce notevolmente nelle diverse parti del mondo. Quelli più largamente usati dal 1950 in poi, sono i composti organoclorati e organofosforici, composti dell'arsenico e del mercurio, erbicidi fenossiacidi, atrazine, piretroidi e ditiocarbammati⁴³.

Il rovescio della medaglia, purtroppo, si concretizzò non solo sottoforma di insetti, erbe infestanti e funghi resistenti, ma anche sottoforma di nuove malattie e fitofagi, resi dannosi dalla distruzione di antagonisti o di iperparassiti, a causa dell'impiego di tali pesticidi. Si pensi che il numero di specie d'insetti resistenti, aumentò del 150% in quindici anni, dal 1965 al 1980.

La prima reazione dell'agricoltore alla comparsa di resistenza, è di aumentare le concentrazioni ed il ritmo dei trattamenti, poi di cambiare il pesticida o di trattare con più sostanze attive, generando così quella che è stata definita, la famosa spirale dei trattamenti⁴⁴.

2.3.4 Classificazione dei pesticidi

I pesticidi possono essere classificati, in base alla struttura chimica del principio attivo (classificazione chimica), all'agente contro cui sono diretti (classificazione funzionale), e alla loro tossicità (classificazione tossicologica).

Obiettivo della classificazione, è identificare tutte le proprietà delle sostanze che possono comportare rischi all'atto della manipolazione e dell'utilizzazione.

⁴² Maroni M, et al. *Gli antiparassitari: normativa, impieghi e strategie di prevenzione*. In: Foà V, Ambrosi L. Med del Lav., Torino, UTET, II ed., 2003, p. 229-260.

⁴³ Hassal KA. *The Chemistry of Pesticides. Their metabolism, mode of action and uses in crop protection*. Weinheim, 1982.

⁴⁴ Musti M. *Prevenzione in agricoltura, agrozootecnica, agroindustria*. In: Foà V, Ambrosi L. Med del Lav. Torino, UTET, II ed., 2003, p. 601-622.

2.3.4.1 Classificazione chimica

Il pesticida, è formato da un miscela di sostanze (formulati) che ne caratterizzano l'azione, e ne migliorano l'efficacia del prodotto stesso. I formulati, sono generalmente costituiti da:

- *principio attivo*: è la sostanza che svolge l'azione diretta nei confronti del patogeno/parassita; ed è pertanto la sostanza dotata di “tossicità intrinseca”. È di norma diluito con altre sostanze (coformulanti) che ne migliorano l'azione, e che spesso divengono determinanti per l'efficacia del prodotto stesso;
- *coformulanti*: sono sostanze costituite da materiale inerte, che vengono generalmente aggiunte al principio attivo, al fine di migliorare la sua azione e la sua persistenza;
- *sostanze inerti* (o solventi): sono sostanze che non svolgono nessuna funzione specifica, ma servono solamente a diluire il principio attivo, favorendo la buona riuscita della formulazione;
- *coadiuvanti*: sono sostanze che favoriscono l'applicazione del pesticida, chiamate anche tensioattivi o surfattanti, e si distinguono in:
 - a) disperdenti: ritardano la sedimentazione delle particelle solide;
 - b) emulsionanti: evitano la separazione tra la parte oleosa e la parte liquida;
 - c) bagnanti: aumentano la bagnatura degli organi vegetali trattati;
 - d) adesivanti: aumentano l'adesività della soluzione;
 - e) antischiuma: limitano la formazione della schiuma.

Molti pesticidi commerciali, indicano la presenza di sostanze cosiddette “inerti”, molte delle quali in realtà tossiche e che possono provocare talvolta effetti tossici, più importanti di quelli della sostanza attiva (es.: PCDD, PCDF, ETU, ecc..) ⁴⁵.

2.3.4.2 Classificazione funzionale

I pesticidi, in funzione della loro attività funzionale, sono classificati in: fungicidi o anticrittogamici, insetticidi, acaricidi, battericidi, nematocidi, fumiganti, diserbanti, molluschicidi, fitoregolatori, repellenti, rodenticidi o talpicidi, viricidi. In particolare:

⁴⁵ Musti M. *Prevenzione in agricoltura, agrozootecnica, agroindustria*. In: Foà V, Ambrosi L. *Med del Lav*. Torino, UTET, II ed., 2003, p. 601-622.

A. Fungicidi: appartengono a questa categoria di prodotti, tutti i principi attivi, la cui azione è diretta contro i patogeni fungini. Le modalità di azione dei fungicidi, nei confronti del patogeno, possono essere: preventiva, curativa, eradicante o antisporulante. La capacità di penetrare o meno nei tessuti vegetali, divide i fungicidi in due grandi categorie:

- *esofarmaci*: chiamati anche di copertura; sono principi attivi non in grado di penetrare nei tessuti vegetali e, pertanto, esplicano la loro azione all'esterno dei tessuti stessi;
- *endofarmaci*: sono principi attivi in grado di penetrare all'interno dei tessuti vegetali e, pertanto, esplicano la loro azione all'interno degli organi vegetali.

B. Insetticidi: appartengono a questa categoria di prodotti, tutti i principi attivi, la cui azione è diretta contro gli insetti. La classificazione degli insetticidi, è strettamente legata alla modalità di penetrazione nel corpo dell'insetto fitofago. Si distinguono, tre diverse modalità di azione: per ingestione, per contatto, per inalazione. Molti principi attivi, specialmente i nuovi insetticidi organici, agiscono penetrando nell'insetto attraverso più vie, senza particolari specificità.

Sono i più discussi, a causa degli effetti causati all'ambiente a partire dai primi composti clororganici utilizzati, e nella maggior parte dei paesi, sono oggi proibiti o sottoposti a severe forme di controllo.

Uno dei più noti, ormai quasi totalmente in disuso, è il DDT (diclorodifeniltricloroetano), ampiamente utilizzato negli anni Quaranta e Cinquanta del XX secolo, contro svariati insetti patogeni e dannosi, e poi abbandonato a causa dei gravissimi danni ecologici causati. Attualmente, gli strumenti più promettenti nella lotta antiparassitaria mirata agli insetti, sono le nuove generazioni di biopesticidi.

C. Acaricidi: appartengono a questa categoria di prodotti, tutti i principi attivi, la cui azione è diretta contro gli acari. La classificazione degli acaricidi, tiene conto principalmente dello stato biologico dell'acaro fitofago bersaglio; infatti questi prodotti, possono svolgere un'azione specifica su un solo stadio del fitofago, oppure agire su alcuni o tutti gli stadi, del suo ciclo biologico.

Spesso si rende necessario miscelare più principi attivi, allo scopo di coprire tutti gli stadi presenti al momento dell'intervento.

- D. Nematocidi:** appartengono a questa categoria di prodotti, tutti i principi attivi, la cui azione, principale o collaterale, è diretta contro i nematodi fitoparassiti, siano essi endoparassiti o ectoparassiti. La maggior parte dei nematodi fitoparassiti vive nel terreno, per cui l'applicazione e l'azione dei nematocidi, avvengono prevalentemente a livello del terreno.
- E. Fumiganti:** appartengono a questa categoria, quei composti formulati in diversi stati fisici che al momento dell'applicazione, producono dei gas che di norma agiscono per asfissia, nei confronti di molte categorie di fitofagi e fitoparassiti (insetti, acari, nematodi e funghi) che svolgono il loro ciclo biologico, in parte o tutto, nel terreno. L'utilizzo di questi prodotti, trova la sua applicazione: negli ambienti chiusi (magazzini, stive, silos); nei terreni di ambienti controllati (serre e tunnel); in pieno campo (con mezzi in distribuzione continua).
- F. Limacidi:** detti anche molluschicidi, sono quei preparati idonei a combattere le lumache e le chioccioline.
- G. Fisioregolatori:** sono quei preparati in grado di prevenire o curare le fisiopatie, cioè le alterazioni dovute a fattori abiotici, quali le climotopatie, le carenze ed intossicazioni alimentari, le chemiopatie, le frigopatie, le fotopatie, le idropatie, le traumopatie.
- H. Fitoregolatori:** sono composti organici sintetici, non nutritivi, che in piccole dosi promuovono, inibiscono o comunque modificano determinati processi fisiologici delle piante, agendo in luoghi diversi da quelli di applicazione, attraverso l'interferenza che essi producono sull'attività degli ormoni naturali (fitormoni) presenti nelle piante⁴⁶.
- I. Diserbanti:** si tratta di mezzi e metodi di lotta, contro le infestanti delle colture. Si distinguono in:

⁴⁶ Maroni M, et al. *Gli antiparassitari: normativa, impieghi e strategie di prevenzione*. In: Foà V, Ambrosi L. Med del Lav., Torino, UTET, II ed., 2003, p. 229-260.

- *geosterilizzanti*: nella tecnica del diserbo, si intendono quei prodotti che agiscono indirettamente sui semi delle piante, rendendo il terreno inadatto al loro sviluppo;
- *antigerminello*: consiste in quei preparati, ad azione erbicida, che controllano le infestanti nel periodo che intercorre tra la fase di germinazione dei semi (sui quali possono agire anche direttamente) e la fase di plantula;
- *erbicidi*: sono quei diserbanti che agiscono direttamente sulla pianta, dalle prime fasi di sviluppo epigeo in poi.

I diserbanti o erbicidi, possono essere selettivi o non selettivi, a seconda che uccidano indiscriminatamente tutte le specie vegetali su cui vengono sparsi, o soltanto alcune varietà specifiche. La maggior parte dei prodotti più recenti, vengono irrorati sulle erbacce durante lo sviluppo, e interferiscono con la loro crescita, senza danneggiare le colture agricole. I diserbanti totali o non selettivi, come il paraquat, il glufosinate ammonico e il glifosate, possono essere utilizzati solo prima che spuntino le piantine seminate. Per velocizzare l'applicazione dei diserbanti alle colture, e favorire un più ampio uso dei diserbanti non selettivi, tuttavia, sono state recentemente sviluppate nuove varietà di patate, frumento, barbabietole da zucchero e tabacco, resistenti agli erbicidi totali. Alcuni nuovi diserbanti, richiedono l'aggiunta di prodotti chimici che potenzino le difese naturali delle piante, contro i principi attivi che determinano l'eliminazione delle erbacce.

2.3.4.3 Classificazione tossicologica

Esistono diverse classificazioni tossicologiche, proposte da varie istituzioni nazionali e internazionali, che suddividono i principi attivi in base alla loro DL₅₀ (dose letale 50%), tenendo quindi conto della tossicità acuta. In Italia il D.P.R. n. 1255 del 3/8/1968 classificava i prodotti fitosanitari, in quattro classi di tossicità acuta, sulla base dei risultati di studi sperimentali condotti su animali per via orale.

Tale classificazione fu poi riveduta nel 1988, con il D.P.R. n. 223 che, in adeguamento alla normativa proposta dalla CEE, prevedeva una suddivisione dei pesticidi, in due classi di tossicità acuta, definite sempre in rapporto alla DL₅₀

calcolata nel ratto, ma introducendo come termine di valutazione oltre alla DL₅₀ per via orale, anche la DL₅₀ per via cutanea.

Anche lo stesso D.Lgs. n. 194/95 disciplina la classificazione tossicologica dei prodotti fitosanitari. L'aspetto più innovativo, è rappresentato dall'inserimento tra i criteri di classificazione di proprietà tossicologiche, inerenti esposizioni ripetute (tossicità subacuta, subcronica e cronica), quali ad esempio: la cancerogenesi, la mutagenesi e la tossicità riproduttiva.

In base alla tossicità delle sostanze, e alla loro concentrazione, i prodotti vengono etichettati con pitogrammi e simboli di avvertimento, secondo il Regolamento (CE) n. 547/2011 dell'8 giugno 2011 che attua il regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, per quanto concerne le prescrizioni in materia di etichettatura dei prodotti fitosanitari.

Sono inoltre riportati in etichetta, alcune frasi di rischio (Frase «R»), utili a identificare in modo immediato il tipo di rischio per la salute, e i cosiddetti «consigli di prudenza» (o Frasi «S»), indirizzati a suggerire provvedimenti di sicurezza adeguati. In particolare nei:

- preparati “*molto tossici*” e “*tossici*”: sono ricompresi i prodotti che possono provocare intossicazioni mortali per l'uomo, in seguito ad assorbimento per qualsiasi via. Il prodotto deve essere contrassegnato in etichetta, da un teschio nero su ossa incrociate, inserito in un riquadro, di colore giallo-arancio e dalla scritta “molto tossico” o “tossico” in base alla tossicità del prodotto, frasi di rischio R40, R45, R49;
- preparati “*nocivi*”: sono ricompresi i prodotti che possono provocare intossicazioni gravi per l'uomo in seguito ad assorbimento per qualsiasi via. Il prodotto deve essere contrassegnato in etichetta, da una croce di S. Andrea nera, inserita in un riquadro di colore giallo-arancio e dalla scritta “nocivi”;
- *altri preparati*, non classificabili come molto tossici, tossici e nocivi: sono i prodotti che possono provocare intossicazione di lieve entità per l'uomo. Il prodotto deve essere contrassegnato in etichetta, da una frase “*attenzione: manipolare con prudenza*”. I prodotti che possono comportare rischi trascurabili per l'uomo, non riportano in etichetta simbologie particolari.

Quindi in base alla recente normativa, i prodotti fitosanitari vengono valutati con

criteri più severi e restrittivi, tenendo conto dei vari rischi che vedono più pericoloso un formulato, rispetto alla tossicità del principio attivo.

Il grado di tossicità si giudica, conoscendo la “dose letale 50%” (DL₅₀) per i prodotti che possono essere assorbiti attraverso la pelle o ingeriti, e la “concentrazione letale 50%” (CL₅₀) per i prodotti assorbiti per inalazione⁴⁷.

2.3.5 Paraquat

Il paraquat, è un erbicida attualmente utilizzato su scala globale, specialmente nei Paesi in via di sviluppo, e probabilmente uno dei più sfruttati, per la lotta contro piante verdi infestanti. La sua sintesi risale al 1882, ma fu solo nel 1955 che si iniziò a sfruttarlo come erbicida.

Il paraquat in primo luogo, è stato prodotto (principio attivo) per scopi commerciali, a partire dal 1961 dalla società ICI (ora Syngenta, società multinazionale agrochimica basilese - Svizzera), e costituisce la sostanza principale che compone il Gramoxone, uno dei tre diserbanti ancora oggi tra i più diffusi ed utilizzati al mondo, commercializzato a livello globale con il marchio Gramoxone di Syngenta (in Italia: Seccatutto®).

L'Unione Europea ha autorizzato il paraquat nel 2004, in Italia inserito con il Decreto Ministeriale del 9/4/04, tra le sostanze attive autorizzate ai sensi del D.Lgs. 194/95, successivamente revocato, a seguito della sentenza del Tribunale dell'Unione Europea del 11/07/07. In realtà, già la Svizzera, aveva vietato la produzione e vendita di qualsiasi prodotto fitosanitario contenente paraquat dal 31 dicembre 1989, a causa dei suoi effetti. Successivamente la Svezia, sostenuta dalla Danimarca, Austria e Finlandia, ha portato la normativa della commissione dell'Unione Europea relativa all'autorizzazione in commercio sostanze contenenti paraquat dinanzi alla corte di giustizia Europea, per non aver revocato la sostanza, in quanto non sicura per l'uomo e per l'ambiente. L'11 luglio 2007, la corte ha accettato le contestazioni presentate, annullando il paraquat come sostanza attiva di protezione dell'impianto.

Il Tribunale di primo grado dell'Unione europea (UE), infatti ha vietato il paraquat, un erbicida spesso utilizzato in condizioni pericolose nei Paesi in via di

⁴⁷ Maroni M, et al. *Gli antiparassitari: normativa, impieghi e strategie di prevenzione*. In: Foà V, Ambrosi L. Med del Lav., Torino, UTET, II ed., 2003, p. 229-260.

sviluppo, e nella sua sentenza, la corte ha criticato la Commissione europea per non aver analizzato, in modo approfondito, il grado di tossicità del prodotto per gli esseri viventi, prima di autorizzarne la vendita nel 2003. I giudici sostengono che Bruxelles, non abbia rispettato le esigenze procedurali, supponendo che l'erbicida non avesse alcuna conseguenza sul sistema nervoso di persone e animali.

La società “Syngenta” invece, ha sempre sostenuto che il pesticida non presenta alcun problema, se il suo utilizzo avviene nel rispetto delle necessarie precauzioni. La società multinazionale “Syngenta”, impiega più di 26.000 persone in oltre 90 paesi, con un fatturato che nel 2010 ha raggiunto 11,6 miliardi di dollari, con sede centrale in Basilea (Svizzera).

La fondazione “Syngenta”, nata nel 2001, si propone di offrire alle comunità rurali dei paesi in via di sviluppo, l'opportunità di accrescere il loro livello di sussistenza incoraggiando l'innovazione, introducendo nuove tecnologie sostenibili in agricoltura e mettendoli nella condizione di operare nel mercato.

È da sottolineare che nei Paesi in via di sviluppo, spesso le sostanze vengono però usate a mani nude, come hanno documentato inchieste giornalistiche.

Inoltre, il paraquat al 42% presente nel formulato denominato “gramoxone” ad azione erbicida, risulta facilmente disponibile e acquistabile su internet, specialmente su siti cinesi (Shanghai) in diversi formati, così come tale sostanza risulta essere presente, anche nelle tavolette detergenti per WC, con possibili rischi di inquinamento dell'ambiente.

Composizione chimica del Paraquat

Il paraquat, è un erbicida non selettivo ad ampio spettro, altamente tossico, e commercializzato negli USA in forma liquida, a cui si addiziona un colorante blu scuro, affinché non lo si possa confondere con una bevanda, come ad esempio il caffè. Si aggiunge poi un aroma forte che serve anch'esso da campanello di allarme, e un additivo che provoca il vomito, qualora dovesse essere inavvertitamente ingerito. Il paraquat, commercializzato fuori dagli Stati Uniti, potrebbe non presentare queste caratteristiche.

Il suo aspetto naturale è solido, cristallino, incolore, bianco tendente al giallo, ed igroscopico. La soluzione acquosa, è rosso scura.

La sostanza, si decompone per forte riscaldamento sopra i 300°C, producendo fumi tossici, contenenti ossidi di azoto e acido cloridrico.

Appartiene alla famiglia di erbicidi, a basi di biperidinio. Ha azione corrosiva sui metalli ed è stabile nelle soluzioni acide o neutre, ma è rapidamente idrolizzato dagli alcali. Fortemente solubile in acqua, insolubile invece nei grassi.

Altri membri di questa categoria, includono per esempio il diquat, cyperquat ecc.. Tutte queste sostanze, sono ridotte facilmente allo ione radicale, generando superoxide (superossido) radicale, il quale reagisce con la membrana insatura dei lipidi.

Il paraquat, può essere degradato dalla luce UV, dalla luce solare e dai microrganismi presenti nel terreno. Sono state segnalate alte concentrazioni della sostanza, in campi di marijuana nel Mexico. Piccole quantità di residui, sono state rinvenute su patate trattate con paraquat come disseccante, e la bollitura di queste patate non ha ridotto i residui⁴⁸.

Il paraquat, è fortemente e rapidamente adsorbito dalle particelle di suolo, specialmente in suoli argillosi. Per la sua indisponibilità e resistenza alla degradazione microbica e alla fotodegradazione, il paraquat ha una lunga emivita. I residui legati, persistono per un tempo indefinito, e sono trasportati con i sedimenti nello scorrimento superficiale. L'emivita segnalata nel terreno, va da 16 mesi a 13 anni. I residui di paraquat, scompaiono rapidamente dall'acqua, per effetto di legami con le erbe acquatiche e per la forte aderenza ai fanghi di fondo. Il paraquat, spruzzato sulla superficie di un suolo sabbioso, non si degrada e pertanto, persiste dopo essere stato irradiato per 2 anni, con la luce naturale⁴⁹.

Modo di azione

La sua azione, si esplica in presenza della luce, ed essicca le parti verdi di tutte le piante, con cui viene in contatto. Dopo l'applicazione, la penetrazione entro la superficie fogliare, avviene quasi all'istante.

L'assorbimento aumenta, ad opera dell'intensità luminosa, dell'umidità e dell'aggiunta di un additivo non ionico nella formula che assicura la ritenuta del prodotto irrorato, e una bagnatura ottimale del fogliame.

⁴⁸ National Library of Medicine. Hazardous Substances Databank. Paraquat. 1992.

⁴⁹ U.S. Environmental Protection Agency. Office of Drinking Water. Paraquat Health Advisory. August, 1987.

Considerazioni

In definitiva, viste le osservazioni anzidette, così come quelle sostenute dalla Corte di giustizia europea, nasce di conseguenza la domanda sul perché questa sostanza ancora oggi, è in commercio negli altri paesi del mondo, ma soprattutto viene ancora largamente utilizzata. La risposta (secondo la Syngenta), è da ricondurre al fatto che il paraquat, è un principio attivo da lungo tempo utilizzato per la protezione delle piante, ma sorprendentemente, in oltre 40 anni di ricerca, non è stato identificato nessun altro erbicida con le stesse proprietà. Non vi è pertanto, alcuna alternativa efficace al paraquat. Di conseguenza, la domanda di paraquat continua, stimolata dagli agricoltori che riconoscono i vantaggi unici del paraquat: la rapida azione di contatto, la resistenza alla pioggia e l'eccellente efficacia.

2.3.6 Seccatutto

Il seccatutto, è stato il diserbante più diffuso in Italia, grazie alla sua rapida efficacia e rapidità d'uso. Classificato come molto tossico, è stato prodotto e distribuito dalla società "Syngenta". Principi attivi: Paraquat al 11,8% (130gr/L), Diquat al 5,9% (65 gr/L).

Il suo spettro d'azione, e le sue caratteristiche d'uso, sono: disseccante, utilizzato nelle piazzole di raccolta di olivo e nocciolo, ai bordi stradali, argini e scoline ecc... Data l'elevata tossicità del prodotto, il suo acquisto ed uso, è consentito esclusivamente al personale qualificato, munito del patentino di cui all'art. 25 del DPR 290/2001.

Registrato (n° 5378 del 11/05/1983) tra le sostanze attive dei fitosanitari, autorizzate per l'immissione in commercio, sospeso e poi ri-registrato con Decreto Ministero Sanità del 5/7/2005 fino al 31/7/2011 (G.U. n. 176 del 30/7/2005). Il prodotto è stato revocato dal 01/09/2007, a seguito della Sentenza della Corte di Giustizia Europea, commercializzato fino al 10/07/2008, con scorte utilizzabili fino al 10/07/2008. Prodotti simili per composizione (5 formulati):

1. "Gramoxone 5" con Paraquat 5%;
2. "Gramoxone W" con Paraquat 18,5%;
3. "Paraquone" con Paraquat 18%;

4. “Quad” con Diquat 17%;
5. “Reglone W” con Diquat 17%.

Elenco esemplificativo di preparati a base di Paraquat dichloride, commercializzati in Italia (23 formulati):

N°	Formulato	Rif. registrazione	Stato d'uso
1	Diserbax	624 del 17/02/1972	Revocato
2	Disseccante caffaro	2538 del 06/04/1977	Revocato
3	Gesatop P	6184 del 15/01/1985	Revocato
4	Gramazin	1556 del 08/05/1976	Revocato
5	Gramixel	2140 del 06/04/1976	Revocato
6	Gramoxone	629 del 23/03/1976	Revocato
7	Gramoxone 5	768 del 23/03/1976	Revocato
8	Gramoxone 5S	906 del 23/03/1976	Revocato
9	Gramoxone W	625 del 23/03/1976	Revocato
10	Gramoxone WR	574 del 05/04/1976	Revocato
11	Paraquat Isagro	4785 del 17/05/1982	Revocato
12	Paraquin	4760 del 13/05/1982	Revocato
13	Paraquone	2135 del 23/03/1976	Revocato
14	Pared	2136 del 23/03/1976	Revocato
15	Priglone 4-10	1254 del 23/03/1976	Revocato
16	Secantin	633 del 21/12/1971	Revocato
17	Seccatutto	5378 del 11/05/1983	Revocato
18	Silquat	5527 del 09/11/1983	Revocato
19	Simaquat Pasta	4779 del 10/05/1982	Revocato
20	Tota-Col	1363 del 09/04/1976	Revocato
21	Valquat	3034 del 05/03/1979	Revocato
22	Velox	9406 del 20/10/1997	Revocato
23	WeedoL Granulare	582 del 23/03/1976	Revocato

Elenco esemplificativo di preparati a base di Diquat dibromide, commercializzati in Italia (16 formulati):

N°	Formulato	Rif. registrazione	Stato d'uso
1	Diclan	626 del 17/02/1972	Revocato
2	Dival 10	7492 del 25/05/1988	Revocato
3	Erbitan Liquido	5602 del 28/12/1983	Revocato
4	Erbitox Totale	3401 del 07/02/1980	Revocato
5	Gramoxone WR	574 del 05/04/1976	Revocato
6	Gramox-R 10	1256 del 29/09/1973	Revocato
7	Gramox-R 5	1255 del 05/10/1973	Revocato
8	Priglone 4-10	1254 del 23/03/1976	Revocato
9	Reglex	2194 del 15/04/1976	Revocato
10	Reglex 10	2108 del 12/04/1976	Revocato
11	Reglone W	630 del 23/03/1976	Autorizzato
12	Seccatutto	5378 del 11/05/1983	Revocato
13	Sildiquat	5335 del 05/05/1983	Revocato
14	Silfotal	5522 del 21/01/1984	Revocato
15	Velox	9406 del 20/10/1997	Revocato
16	Weedol Granulare	582 del 23/03/1976	Revocato

2.3.7 Esposizione sull'uomo e interazione con l'ambiente

Il fatto che i pesticidi consentano di preservare la naturale crescita delle colture, non ci autorizza a farne un uso spropositato. L'esposizione diretta o indiretta delle persone e dell'ambiente a tali sostanze, infatti, può avere effetti negativi; quali disturbi cronici e a lungo termine, particolarmente preoccupanti nei bambini, nelle persone anziane e nei lavoratori esposti a tali sostanze, mentre sul piano ambientale, possono essere causa di contaminazione dell'acqua, dell'aria o del suolo. Le molecole chimiche delle miscele, possono disperdersi nell'aria, e colpire l'organismo non bersaglio. Inoltre, raggiungendo le falde acquifere o penetrando nel suolo, possono provocare danni alle vegetazioni spontanee o agli insetti utili, come le api.

2.3.8 I soggetti esposti

I soggetti esposti a pesticidi, possono essere divisi in due grandi gruppi: i soggetti professionalmente esposti e la popolazione generale.

La *popolazione generale*, può essere esposta a pesticidi, attraverso l'assunzione di cibi e bevande contaminati, o a causa di trattamenti condotti in prossimità dei luoghi di residenza o di transito. È possibile inoltre, un'esposizione per via aerea in ambienti confinati, conseguente al lento rilascio di pesticidi persistenti da manufatti trattati.

In *ambito professionale*, l'esposizione a pesticidi, riguarda i lavoratori dell'industria addetti alla sintesi dei principi attivi e alla formulazione e confezione dei prodotti e, come utilizzatori, i lavoratori agricoli e gli addetti in sanità pubblica alle opere di disinfezione e disinfestazione. Possono inoltre essere esposti a pesticidi, anche lavoratori operanti in ambiti industriali, ove questi prodotti, trovano impiego per la protezione degli impianti o dei prodotti, dalla degradazione biologica, quali ad esempio: l'industria delle pelli, della carta, del legno e delle vernici.

I lavoratori dell'industria di produzione, sono solitamente esposti a un numero limitato e ben definito di composti, sotto forma di sostanze concentrate, in alcuni casi miscelate con intermedi di sintesi e altre sostanze. L'esposizione, è in genere continua per lunghi periodi di tempo, e avviene in ambienti confinati; la via inalatoria rappresenta la principale via di assorbimento, e il livello di esposizione

è solitamente costante, ma in genere ben controllato dai sistemi di sicurezza presenti.

I lavoratori agricoli, invece, utilizzano in genere numerosi pesticidi, in forma diluita e per limitati periodi di tempo. I livelli di esposizione in agricoltura sono inoltre estremamente variabili e dipendono da numerosi fattori, tra i quali: l'estensione dei campi da trattare, il tipo di coltivazione, il modo di applicazione, la professionalità dell'operatore, le condizioni climatiche e l'utilizzo di sistemi di protezione individuale.

Tutti questi fattori, rendono i livelli dell'esposizione, difficilmente prevedibili e strettamente correlati a determinanti soggettive e ambientali. La via di esposizione prevalente in questi lavoratori, è rappresentata dalla cute^{50,51}.

2.3.9 Uso incontrollato di pesticidi

Come già accennato, l'uso indiscriminato dei pesticidi, può avere serie ripercussioni sulla salute dell'uomo. Infatti i rischi, sono riconducibili a diversi fattori:

- a) la durata d'esposizione e l'azione combinata di più pesticidi;
- b) la quantità di pesticida a cui si è esposti;
- c) il tipo di pesticida.

Rispetto al primo aspetto, uno studio di Costello, ha dimostrato che esiste una stretta correlazione tra lo sviluppo del morbo di Parkinson e l'esposizione prolungata a pesticidi⁵². Lo studio epidemiologico in questione, è stato condotto nella Central Valley della California, una delle maggiori aree colturali al mondo, ove si è fatto largo uso di pesticidi come il "paraquat" (erbicida altamente tossico), e fungicidi come il "maneb" (fungicida ditiocarbammati). Nei residenti, i ricercatori hanno riscontrato che anni di esposizione alla combinazione di questi due pesticidi, hanno aumentato il rischio di Parkinson del 75%. In particolare si è

⁵⁰ Hertzman C, et al. *Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors*. Am J Ind Med., 1990; 17(3), p. 349-355.

⁵¹ Lai BC, et al. *Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord., 2002; 8(5), p. 297-309.

⁵² Costello S, et al. *Parkinson's disease and residential exposure to Maneb and Paraquat*. 2009. In: *Agricultural applications in the Central Valley of California*, pp 1-8.

notato che gli individui più sensibili, risultano essere i più giovani, o coloro che sono stati esposti ai pesticidi fin da piccoli.

Questo particolare studio, sottolinea la pericolosità di un uso massivo di pesticidi, e soprattutto come la loro combinazione, possa risultare altamente tossica. Diverse sostanze assunte simultaneamente, seppur a piccole dosi e sotto i limiti stabiliti dalla legge, possono avere un effetto cancerogeno.

Ad oggi, si è ancora troppo incentrati a studiare i rischi relativi a singoli principi attivi e su tali studi si basa, anche la definizione dei limiti massimi di residuo (LMR), sanciti dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA); invece, sarebbe fondamentale che le indagini sui rischi annessi all'uso di pesticidi riguardassero l'azione combinata di più principi attivi e tanto più, di quelli, che più frequentemente vengono utilizzati in sincrono o che magari sono miscelati.

2.3.10 Uno sguardo ai bambini

Le motivazioni degli effetti particolari dei pesticidi sui bambini, sono da ricondurre all'esposizione anche indiretta che può avvenire in diverse fasi della crescita e dello sviluppo, a partire dal periodo pre-natale: prima del concepimento, attraverso la contaminazione del liquido seminale, oppure nell'utero, ma anche attraverso il latte materno e la contaminazione del cibo, dell'acqua, del suolo e dell'aria.

Lo studio ha evidenziato inoltre, la sinergia tra gruppi diversi di pesticidi: tra gli organofosforati (Diclorvos, Fenamifos, Malation, Metamidofos, Foxim e Terbufos), erbicidi (Paraquat e Picloram), nonché fungicidi (Benomil e Mancozeb)⁵³.

Il rischio sembra essere tanto più alto se durante la gravidanza è la madre ad essere entrata in contatto con i pesticidi⁵⁴.

La situazione è tutt'altro che rassicurante, considerando l'utilizzo ancora diffuso che si fa dei pesticidi; è fondamentale che gli studi scientifici, su tali tematiche, siano incentivati il più possibile, tenuto conto del fatto che la normativa, non tiene ancora nel debito conto il possibile effetto sinergico di più sostanze attive,

⁵³ Gurunathan S, et al. *Accumulation of chlorpyrifos on residential surfaces and toys accessible to children*. Environ Health Perspect., 1998; 106(1), p. 9-16.

⁵⁴ Lopez-Espinosa MJ, et al. *Organochlorine pesticides in placentas from Southern Spain and some related factors*. Placenta, 2007; 28 (7), p. 631-638.

presenti su uno stesso campione (multi residuo), perché solo incentivando la ricerca in tal senso, si potranno raggiungere obiettivi di uso sostenibile dei pesticidi.

Pur apprezzando gli sforzi che la Commissione Europea e l'Efsa, organo preposto alla valutazione del rischio di esposizione ai pesticidi, stanno compiendo per promuovere un uso sostenibile dei pesticidi, ancora preoccupante risulta essere la loro rintracciabilità nell'ambiente, per tutto il lasso di tempo occorrente per lo smaltimento delle scorte.

2.3.11 Interazione con l'ambiente

I pesticidi hanno due peculiarità che li distinguono dalle altre sostanze, utilizzate nel mondo del lavoro: sono *volontariamente* dispersi nell'ambiente, nella lotta contro i parassiti che si desidera controllare, ma la loro *specificità* per gli organismi bersaglio, può non essere completa, per cui vi è la possibilità di effetti indesiderati nei confronti di organismi non-bersaglio, compreso l'uomo.

I pesticidi, subiscono naturalmente un degrado ad opera dell'ambiente: a partire dal momento del trattamento, si sviluppano azioni di denaturazione del principio attivo, che vengono svolte sia dagli elementi climatici (pioggia, luce e temperatura) che da azioni dirette di metabolizzazione, intra o extra tessutale di alcuni vegetali, che trasformano il principio attivo in sostanze non più tossiche.

Il periodo di "vita", di un pesticida è una sua caratteristica intrinseca e dipende fondamentalmente dalla stabilità chimica della sua molecola. In virtù di questo decadimento, dopo un certo periodo di tempo, la presenza sui vegetali di questi residui o dei loro metaboliti deve essere molto bassa, o comunque, tale da non provocare danni all'uomo.

Questo intervallo di tempo, chiamato *periodo di carenza* o *tempo di sicurezza*, è previsto dalla normativa vigente, è caratteristico per ogni pesticida nonché per ogni specie coltivata, ed è obbligatoriamente indicato, sulla confezione commerciale; per cui è indicato il numero di giorni che devono trascorrere tra l'ultimo trattamento, la raccolta del prodotto ed il suo eventuale consumo⁵⁵.

⁵⁵ Maroni M, et al. *Gli antiparassitari: normativa, impieghi e strategie di prevenzione*. In: Foà V, Ambrosi L. *Med del Lav.*, Torino, UTET, II ed., 2003, p. 229-260.

I pesticidi, si diffondono nell'ambiente facilmente, durante le fasi d'irrorazione dei prodotti ortofrutticoli da trattare, e possono così contaminare le acque. In particolare, la contaminazione dei corpi idrici superficiali, può verificarsi attraverso tre vie principali: deriva, ruscellamento superficiale e drenaggio; per deriva, si intende appunto il trasporto, ad opera del movimento dell'aria, delle goccioline che compongono l'aerosol emesso dalle macchine irroratrici, durante l'applicazione della miscela fitoiatrice. In questo modo una parte del prodotto, può ricadere nei corpi idrici nelle vicinanze dell'area trattata.

CAPITOLO 3

SISTEMI DI PREVENZIONE

Già nel 1986, con la Conferenza di Ottawa, l'OMS lanciò la parola d'ordine della *promozione della salute*, fondandola proprio su una concezione socio-ecologica della salute medesima. Nella *Carta di Ottawa*, l'ambiente veniva giustamente indicato, come uno dei fattori determinanti della salute medesima, e la protezione dell'ambiente veniva esplicitamente individuata, accanto ad altre (con essa collegate, il miglioramento delle condizioni di lavoro, ecc..), come una delle modalità strategiche più significative, per promuovere il benessere fisico, psichico e sociale delle popolazioni del mondo. L'ottica di Ottawa, rende necessaria una sempre maggiore integrazione progettuale e operativa, tra il sistema della promozione della salute e il sistema della protezione ambientale, allo scopo di individuare e rimuovere i rischi per l'ambiente e per la salute.

Inoltre ad Ottawa, la promozione della salute, venne definita come il processo che mette in grado le persone (i cittadini, i lavoratori, i consumatori), di aumentare il controllo sulla propria salute e di migliorarla consapevolmente e attivamente.

3.1 Introduzione

I benefici economico-sociali e di salute individuale, derivanti da interventi di prevenzione primaria, sono già noti.

La ricerca clinica, è da sempre orientata verso nuovi metodi, per prevenire o ritardare la morte neuronale nelle malattie neurodegenerative.

Infatti, i processi industriali, le diverse forme di antropizzazione, l'ampio utilizzo di sostanze chimiche, comportano che una larga frazione della popolazione umana, sia quotidianamente esposta ad un elevato numero di fattori tossici e inquinanti a più livelli biologici (genetici, morfologico-embrionali, citologici, fisiologici, molecolari), diffusi nelle diverse matrici ambientali (acqua, aria e suolo), che possono indurre danni immediati o differiti sulla salute umana.

Il rapporto con l'ambiente è, quindi, una delle determinanti fondamentali per lo stato di salute della popolazione umana, la relazione tra l'individuo e i diversi fattori ambientali, può avere risvolti diversi sull'equilibrio salute-malattia.

In generale, la prevenzione delle malattie di origine ambientale, richiede un intervento sinergico, su comportamenti individuali, stili di vita, norme e misure istituzionali che consentano di garantire la sicurezza della popolazione esposta ai rischi ambientali.

Negli ultimi anni, le linee di ricerca stanno ponendo maggiore attenzione alla connessione tra prevenzione delle patologie e studio dell'ambiente, nelle sue componenti abiotiche e biotiche potenzialmente patogene¹.

I dati sulla tossicità di molte sostanze, sono ignoti per il fatto che, attualmente, meno della metà delle migliaia dei composti chimici usati sono stati testati, ma soprattutto gli attuali test di tossicità, raramente comprendono lo studio delle funzioni neurocomportamentali.

I risultati evidenziano che, spesso, un'esposizione a sostanze neurotossiche nell'infanzia, può portare ad un maggior rischio di Parkinson e di altre malattie neurodegenerative^{2,3}.

Dal momento che la gran parte di questi composti, sono prodotti in quantità notevoli, una particolare attenzione deve essere posta, nei riguardi delle esposizioni occupazionali, del rilascio nell'ambiente e dell'esposizione della popolazione, attraverso il consumo di prodotti contaminati od utilizzo di manufatti, per quanto concerne i livelli di concentrazione di esposizione, i tempi e la modalità dell'esposizione stessa. Inoltre, è necessario considerare l'effetto sinergico dei composti chimici. Miscele di composti, possono costituire fattore di rischio diverso, rispetto al singolo composto, modulandone e/o incrementandone la tossicità.

3.2 Epidemiologia come collegamento fra fattori di rischio, effetti sulla salute e prevenzione

L'epidemiologia, è uno dei più importanti strumenti usati nella gestione dell'igiene ambientale, per la sua capacità di valutare i fattori di rischio

¹ Sturchio E, et al. *Indicatori ambientali microbici e vegetali per la determinazione dello stato di salute ambientale in seguito a rilascio di inquinanti dovuto al "fall out"*. Ingegneria Ambientale. 2007; 36(4), p. 164-174.

² Langston JW, et al. *Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure*. Ann Neurol., 1999; 46(4), p. 598-605.

³ Calne DB., et al. *Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and motoneurone disease: abiotrophic interaction between ageing and environment?* Lancet. 1986; 2(8515), p. 1067-1070.

ambientale, come potenziale causa di malattia e di quantificare il loro impatto sulla salute, nella popolazione a rischio. Essa fornisce pertanto, l'informazione necessaria per definire le priorità per l'azione preventiva e può anche contribuire al monitoraggio e alla valutazione dell'efficacia di tale azione, per cui, l'epidemiologia è cruciale per risolvere i problemi di salute, inerenti l'ambiente.

Nell'epidemiologia ambientale, i fattori di rischio, come determinanti, possono essere classificati in molti modi, a seconda delle loro caratteristiche o fonti: biologici, chimici, fisici, psico-sociali o correlati alla sicurezza⁴.

Pertanto, i problemi sanitari e i fattori che li determinano sono inescindibilmente connessi con gli ambienti (biologico, fisico e socioculturale) e gli ecosistemi (gli organismi viventi e le condizioni di vita interdipendenti), nei quali sono inseriti.

Fra i fattori socioculturali, che influiscono sulla salute a livello di comunità figurano: la qualità della vita e lo stato di salute delle popolazioni, la classe sociale, l'appartenenza razziale ed etnica, la politica, l'economia, la religione, il linguaggio, le credenze, i valori e le norme di comportamento⁵.

Studi di epidemiologia su problemi di igiene ambientale, spesso mirano a fissare o migliorare le conoscenze scientifiche della relazione causale fra esposizione ambientale e malattia, e a monitorare gli interventi.

3.2.1 Percezione e comunicazione del rischio

In alcuni paesi, i rischi ambientali per la salute, stanno ricevendo un'attenzione crescente da parte dei mass media, con il risultato che spesso si lanciano allarmi riguardanti nuove minacce provenienti da fattori ambientali. Molto spesso, tuttavia, la preoccupazione è basata non su prove derivanti da studi epidemiologici, ma su prove di tossicologia animale, o sulla descrizione di una casistica basata solamente su pochi individui presumibilmente colpiti. Normalmente i media, non prendono in considerazione le implicazioni di sanità pubblica, quando diffondono notizie su questi rischi per la salute. Tali implicazioni, devono essere analizzate, al fine di stabilire le priorità per la prevenzione. Un processo decisionale razionale in materia di prevenzione, sarebbe

⁴ Last J. *A dictionary of epidemiology, 3rd edition*. 1995, Oxford: Oxford University Press.

⁵ Briss PA, et al. *Developing an evidence-based Guide to Community Preventive Services--methods. The Task Force on Community Preventive Services*. Am J Prev Med., 2000; 18(1 Suppl), p. 35-43.

avvantaggiato, se si basasse di più sull'epidemiologia ambientale. Tuttavia, vari fattori complicano l'utilizzo dell'epidemiologia ambientale, come base per la valutazione del rischio sanitario. Tra questi, per esempio, il lungo periodo di latenza di alcuni effetti: gli studi epidemiologici potrebbero non produrre, infatti, risultati informativi se non molti anni dopo l'introduzione di un fattore di rischio nell'ambiente.

Dal momento che l'epidemiologia ambientale, opera nel contesto del rischio, gli epidemiologi devono imparare come valutarlo e come comunicarlo⁶.

3.3 Monitoraggio dell'esposizione e sorveglianza della salute

Il Centers for Disease Control (CDC) degli Stati Uniti, definisce “sorveglianza della salute pubblica”, come il monitoraggio di malattie o dei fattori di rischio nelle *popolazioni*.

Gli scopi della sorveglianza in sanità pubblica, sono:

- identificare o confermare l'esistenza di un problema di salute pubblica;
- definire la portata del problema;
- identificare e definire con precisione le popolazioni per la prevenzione e l'intervento;
- valutare l'efficacia del programma di intervento o di prevenzione.

In generale, l'informazione ottenuta attraverso la sorveglianza di un particolare contaminante e dei suoi effetti correlati sulla salute, può essere categorizzata come segue:

- informazione sulle fonti dell'inquinante, comprendente la frequenza e le quantità del rilascio, e le principali matrici colpite (alimenti, aria, suolo e acqua);
- caratteristiche del comportamento dell'agente nell'ambiente (es. trasporto, cambiamenti chimici, interazione con gli esseri viventi e destino);
- livelli di concentrazione del contaminante nelle matrici che possono rappresentare una esposizione dannosa per l'uomo;
- caratteristiche e modalità di esposizione all'agente ambientale della popolazione a rischio;

⁶ Baker F. *Risk communication about environmental hazards*. J Public Health Policy. 1990; 11(3), p. 341-359.

- informazione sulla comparsa di effetti dannosi (tipo, frequenza e gravità), nella popolazione a rischio di esposizione. Dati sugli effetti dannosi, possono essere prodotti a livello pre-clinico (monitoraggio biologico, screening o indagini sanitarie), a livello clinico (monitoraggio della salute, sistemi di segnalazione o registri specializzati), e da certificati di morte.

3.4 I fattori di rischio: definizioni

La gestione dell'igiene ambientale, comporta la massima riduzione possibile dei rischi per la salute. Per ridurre tali rischi, dobbiamo cercare informazioni su:

- fattori di rischio che si trovano in determinati ambienti;
- gruppi di popolazione che sono esposti;
- livello a cui essi sono esposti;
- impatti sulla salute che tali fattori potrebbero avere o hanno;
- potenziali approcci per ridurre l'esposizione;
- accettabilità di questi approcci nella popolazione esposta.

3.5 Valutazione del rischio (risk assessment)

Gli anni Settanta, furono un periodo di aumentata preoccupazione generale, sugli effetti della tecnologia nell'ambiente. Molti governi sono stati sollecitati dai cittadini, a mettere in atto politiche di regolamentazione, sulla base delle evidenze scientifiche emerse sui possibili effetti sulla salute dell'uomo, dei numerosi agenti chimici e microbiologici. Furono istituiti nuovi programmi governativi, per identificare e regolare questi fattori di rischio per l'uomo e per l'ambiente. Al fine di aiutare questa attività decisionale, fu sviluppato il processo di "valutazione del rischio", come mezzo per identificare e stimare i rischi per la salute delle popolazioni umane. Il termine "valutazione del rischio", usato per decenni in sanità pubblica, assunse un significato specifico nel processo regolatore ambientale. Nella messa a punto di regolamentazioni, la valutazione del rischio è usata come una base fattuale, per definire gli effetti sanitari dell'esposizione all'inquinante di interesse, da non confondere con la gestione del rischio (risk management), che è il processo di verifica delle politiche alternative e di selezione dell'azione regolatrice più appropriata.

3.5.1 Inquadramento della valutazione del rischio

La normativa europea, prevede oggi che la valutazione del rischio debba essere effettuata a livello Europeo, al fine di una prevenzione e protezione complessiva: della qualità dell'acqua potabile, dell'aria, delle esposizioni lavorative e di altri analoghi aspetti.

Il quadro di riferimento ufficialmente adottato dall'Unione Europea per la valutazione del rischio delle sostanze "nuove" ed "esistenti", prevede la necessità di analizzare e stimare i rischi connessi all'esposizione nell'ambiente di vita, di lavoro e dei consumatori.

Agli aspetti correlati alla salute umana, si aggiungono in queste valutazioni agli aspetti più propriamente ambientali, come i rischi per gli ecosistemi terrestri e acquatici, i processi di accumulo e bioaccumulo, e il contributo a effetti di inquinamento ambientale a livello di area estesa, internazionale e globale.

La valutazione del rischio, può essere definita come "la caratterizzazione del potenziale effetto sanitario dannoso dell'esposizione umana, ad un fattore di rischio ambientale"⁷.

In altre parole, essa produce una stima quantitativa del rischio dell'uomo per un fattore specifico, basata sulla disponibilità di dati di esposizione. I quattro momenti fondamentali della valutazione del rischio, sono:

- a) l'identificazione del rischio;
- b) la valutazione dell'esposizione;
- c) la valutazione della dose-risposta;
- d) la caratterizzazione del rischio.

3.5.2 L'analisi/identificazione dei rischi all'uso dei pesticidi

Occorre, procedere ad una valutazione del rischio per tutte le attività in cui sono utilizzati pesticidi, sia da soli sia nei loro miscugli.

Analisi dei rischi, e informazioni utili da osservare, in relazione alle seguenti attività collegate sono:

- a) *acquisto e vendita;*
- b) *depositi di sostanze pericolose in azienda agricola;*

⁷ Aldrich T, Griffith J. *Environmental Epidemiology and Risk Assessment*. Van Nostrand Reinhold, New York, 1993.

- c) *trasporto e movimentazione;*
- d) *preparazione;*
- e) *distribuzione/utilizzo;*
- f) *smaltimento residui;*
- g) *gestione degli eventi accidentali.*

a) *Acquisto e vendita:*

L'acquisto, comporta la responsabilità del corretto uso dei pesticidi da ravvisarsi in capo a chi li ha acquistati, come pure la responsabilità relativa all'ideonea conservazione ed il corretto impiego del prodotto. Il titolare del patentino, non può né rivendere né regalare ad altre persone i pesticidi.

Inoltre, è fatto divieto di acquistare in nessun caso, pesticidi in confezioni che risultino non sigillate o non originali, neppure se il rivenditore ne garantisce la provenienza.

b) *Depositi di sostanze pericolose in azienda agricola:*

- il locale di deposito, deve essere ubicato, lontano dai luoghi di lavoro;
- all'esterno del deposito, deve essere applicato un cartellone "nozionistico" (*ossia indicante le regole da rispettare*);
- l'accesso agli estranei, deve essere impedito tramite chiusura a chiave;
- i locali devono essere freschi, asciutti e sufficientemente areati;
- devono essere esposti cartelli di segnalazione di pericolo;
- devono essere disponibili scaffalature, posizionate idoneamente, realizzate con materiali facilmente lavabili, e ben fissate al muro o al pavimento;
- i pesticidi devono essere conservati nei contenitori originali, ai fini di una più immediata individuazione della sostanza;
- devono essere evitati travasi, in contenitori non etichettati e/o per alimenti.

c) *Trasporto e movimentazione:*

- evitare il trasporto congiunto di passeggeri e derrate alimentari;
- evitare la collocazione, in prossimità di oggetti taglienti o acuminati;
- usare sempre i D.P.I. protettivi, per proteggersi da eventuali rotture accidentali dei contenitori.

d) Preparazione:

In genere, si tratta di prodotti già confezionati e pronti all'uso ed. è opportuno, caso per caso, valutare le seguenti precauzioni:

- devono essere sempre esaminate le istruzioni di sicurezza;
- si deve sempre prendere atto delle nozioni di prevenzione/pronto soccorso;
- la miscelazione dei prodotti, deve essere condotta in ambiente aperto e ben ventilato;
- si deve prestare attenzione all'assenza di vento;
- deve essere disponibile una riserva di acqua, per lavarsi in caso di necessità;
- devono essere utilizzate adeguate D.P.I. (tuta, guanti, stivali, maschera, occhiali);
- devono essere preventivamente calcolate le quantità necessarie per la distribuzione, al fine di evitare di dover gestire un eccesso di residui;
- devono essere presi provvedimenti, per evitare il rovesciamento dei contenitori;
- devono essere evitati problemi di incompatibilità tra prodotti;
- si deve prestare molta attenzione, nella fase di caricamento delle cisterne e/o contenitori utilizzati per il trattamento (*rischio di scivolare sui gradini, di rovesciamento del secchio allo svuotamento ecc..*).

e) Distribuzione/Utilizzo:

- Data l'elevata tossicità della maggior parte dei pesticidi (come il paraquat), il suo acquisto e la sua distribuzione, deve essere effettuata solo da personale qualificato;
- rispettare le distanze di sicurezza, indicate sull'etichetta dei prodotti e sugli eventuali regolamenti locali;
- la distribuzione deve essere condotta, rimanendo lontani da strade, da edifici, da corpi idrici, da animali, da persone;
- devono sempre essere utilizzate, protezioni adeguate ed adatti allo scopo (*guanti e stivali antisdrucchiolo in gomma; maschera a doppio filtro; tuta, occhiali*);
- deve essere sempre disponibile una tanica di acqua pulita, in caso di contaminazione;

- effettuare preferibilmente i trattamenti, nelle ore più fresche;
- si deve prestare attenzione, a non irrorare controvento;
- si deve operare, indirizzando il getto dalla zona esterna a quella centrale;
- al termine dell'uso, gli indumenti e i D.P.I., devono essere regolarmente lavati e riposti nel deposito (è preferibile l'uso di indumenti tipo “usa e getta”);
- divieto di utilizzo, con mezzi aerei.

f) Smaltimento residui:

- i contenitori usati, devono essere regolarmente lavati al momento della preparazione;
- deve essere effettuata la raccolta differenziata dei contenitori usati;
- i residui del trattamento, devono essere stoccati in magazzino in contenitori chiusi ed etichettati, per essere successivamente ridistribuiti;
- si deve rispettare il principio di non trasferire prodotti/residui, tra coltivatori/contoterzisti (*l'acquirente originario rimane sempre responsabile di quanto potrebbe accadere*);
- evitare di contaminare l'acqua, con il prodotto o il suo contenitore.

g) Gestione degli eventi accidentali:

In caso di intossicazione, o di contatto accidentale:

- allontanare il soggetto colpito, dalla fonte di intossicazione;
- verificare sull'etichetta i sintomi dell'intossicazione ed i consigli terapeutici;
- non somministrare latte o altre bevande, perché possono facilitare l'assorbimento della sostanza tossica;
- chiamare subito un medico, o trasportarlo al più vicino ospedale;
- portare con sé il contenitore del prodotto utilizzato e consegnare l'etichetta (*e la relativa scheda tecnica, qualora disponibile*) al personale medico;
- evitare di pulire il materiale di applicazione in prossimità delle acque di superficie;
- evitare la contaminazione, attraverso i sistemi di scolo delle acque delle aziende agricole e delle strade.

Per capire, se una delle tante sostanze che si usano nel settore agricolo è pericolosa occorre cercare sulla confezione, gli eventuali simboli segnaletici

(*indicatori di pericolo*), leggere con attenzione l'etichetta e la scheda di sicurezza. Nel caso quest'ultima, non sia resa immediatamente disponibile, occorre richiederla al venditore o al produttore.

3.6 Prevenzione dei rischi per la salute, derivante dall'uso dei pesticidi

L'uso dei pesticidi, in particolare nella protezione delle colture agricole, e la crescente immissione di questi prodotti nell'ambiente, richiedono la messa in opera di misure preventive che riducano al minimo, i possibili danni per la salute dell'uomo. Tali misure possono essere attuate a tre livelli, tra loro complementari: tecnologico, legislativo e igienico-sanitario. In particolare, l'applicazione dei pesticidi, deve essere effettuata con tecniche idonee e secondo procedure di impiego che garantiscano la massima protezione del lavoratore⁸.

Le categorie di lavoratori esposti, per le quali si rende necessario adottare specifiche misure preventive e protettive sono ad esempio: gli agricoltori, che preparano le miscele antiparassitarie ed effettuano i trattamenti alle colture; i lavoratori, che svolgono attività agricole in campi precedentemente trattati; soggetti impiegati a vario titolo durante le fasi di passaggio di un prodotto, dal fabbricante all'utilizzatore e i disinfestatori⁹.

Gli agricoltori, per esempio, devono osservare alcune regole importanti ai fini della prevenzione:

- non devono irrorare il pesticida controvento, o nelle giornate ventose, per non essere investiti dal getto del pesticida, ma anche per evitare il pericolo “effetto deriva” che può far giungere il prodotto sulle coltivazioni vicine o in zone abitate;
- non devono irrorare, durante le prime ore del mattino, o nel pomeriggio avanzato, per evitare l'intensa irradiazione solare;
- non devono effettuare trattamenti nelle giornate con minaccia di pioggia, con il concreto rischio di dover rifare il trattamento;

⁸ Maroni M, et al. *Gli antiparassitari: normativa, impieghi e strategie di prevenzione*. In: Foà V, Ambrosi L. Med del Lav., Torino, UTET, II ed., 2003, p. 229-260.

⁹ Musti M. *Prevenzione in agricoltura, agrozootecnica, agroindustria*. In: Foà V, Ambrosi L. Med del Lav. Torino, UTET, II ed., 2003, p. 601-622.

- devono effettuare la manutenzione periodica e la pulizia regolare degli equipaggiamenti, per evitare la contaminazione degli operatori e dell'ambiente;
- segnalare, con opportuni cartelli, le coltivazioni che sono state oggetto di trattamenti;
- è assolutamente proibito: fumare, mangiare, bere o portare qualsiasi oggetto alla bocca, durante le varie fasi del trattamento.

3.6.1 Effetto deriva e possibile riduzione delle perdite aeree nella distribuzione dei pesticidi

Come già accennato, tra le diverse pratiche che caratterizzano il processo produttivo di una coltura, la distribuzione dei pesticidi per la difesa dai parassiti animali e vegetali, nonché dalle infestanti, rappresenta uno dei punti critici più importanti, dal punto di vista della salute, non solo degli operatori agricoli, ma anche delle loro famiglie e di tutti coloro che abitano in prossimità delle coltivazioni trattate.

Tali trattamenti, danno infatti luogo al cosiddetto “effetto deriva”, ovvero alla dispersione aerea delle particelle di miscela di pesticidi che non raggiungono il bersaglio, rappresentato questo, dalla coltura da trattare o dall'infestante da eliminare, ma si diffondono nell'ambiente circostante.

Le gocce di miscela chimica, vanno in questo modo a inquinare l'aria, l'acqua, il suolo e a colpire non solo l'uomo, ma anche le piante spontanee e gli insetti utili (impollinatori, predatori e parassiti dei fitofagi). Inoltre, direttamente o attraverso il nutrimento, arrivano agli organismi che vivono nel terreno o in prossimità delle coltivazioni, come i piccoli mammiferi, gli uccelli, i pesci, per i quali, questi prodotti, si rivelano spesso altamente tossici o addirittura mortali.

È estremamente importante e urgente, che tutte le categorie interessate pongano maggiore attenzione al problema, e lo affrontino con tecnologie e procedure innovative, che consentano di attuare pratiche sostenibili rispondenti alle pressanti esigenze di protezione ambientale e della salute pubblica, tenuto conto dei provvedimenti legislativi europei sull'uso sostenibile dei pesticidi.

La Direttiva europea sull'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari **COM (2006) n. 373**, il cui testo è stato approvato dal Parlamento europeo nel gennaio 2009,

prevede l'adozione di specifici provvedimenti per il contenimento della deriva, in particolare per i trattamenti alle colture arboree, eseguiti in prossimità di aree sensibili, quali corsi d'acqua, aree abitative ecc..

In Italia il 90% dei trattamenti effettuati, sono quelli di tipo classico a polverizzazione meccanica, privi di aeroconvezione. Pertanto, il controllo della deriva, risulta assai limitato, e l'entità delle dispersioni è talvolta molto elevata.

Relativamente a questi ultimi aspetti, la normativa europea è intervenuta al fine di regolamentare questo settore, attraverso l'introduzione della **Direttiva 2009/127/CE** del 21 ottobre 2009 – direttiva sulle macchine per l'applicazione dei prodotti fitosanitari di modifica della direttiva 2006/42/CE; e con il **Regolamento (CE) n. 127/2009** del 5 febbraio 2010 - recante modifica del regolamento (CE) n. 2042/2003, sul mantenimento della navigabilità di aeromobili e di prodotti aeronautici, parti e pertinenze, nonché sull'approvazione delle imprese e del personale autorizzato a tali mansioni.

3.6.2 I dispositivi di protezione individuale

L'uso di adeguati mezzi di protezione personale (guanti, occhiali, tute, stivali, maschere facciali con filtri specifici, o trattori chiusi e condizionati), è di estrema importanza per limitare l'esposizione dei lavoratori. Nel lavoro agricolo e nelle attività di disinfestazione, tali mezzi vanno utilizzati non solo durante l'applicazione dei prodotti, ma anche in occasione della miscelazione e diluizione dei preparati. L'impermeabilità del vestiario protettivo è indispensabile. A volte, le condizioni climatiche rendono intollerabile l'uso di mezzi di protezione personale; in questi casi, è importante raccomandabile effettuare le operazioni nelle ore meno calde nonché selezionare mezzi di protezione adeguati e tollerabili per l'operatore (ad esempio, tute di cotone)¹⁰.

Per quanto riguarda specificatamente i coltivatori, è esperienza comune, che i mezzi di protezione individuale siano complessivamente poco e male utilizzati e che tale fenomeno non sembri modificarsi nel tempo, in quanto l'impiego dei mezzi di protezione individuale, determina sicuramente un elemento di disagio, che viene rifiutato dagli addetti non opportunamente informati sulla necessità di

¹⁰ Musti M. *Prevenzione in agricoltura, agrozootecnica, agroindustria*. In: Foà V, Ambrosi L. *Med del Lav*. Torino, UTET, II ed., 2003, p. 601-622.

tale uso.

I fattori, che ne condizionano più fortemente la scelta e l'impiego, risultano essere costituiti dal comfort e dall' *indossabilità*, cioè dalla minore interferenza possibile con il movimento e l'attività, non meno rilevante è altresì il fattore economico concernente l'esosità dal punto di vista economico degli stessi¹¹.

3.6.3 I tempi di rientro

La specifica norma di riferimento, che stabilisce il tempo necessario, perché i lavoratori possano rientrare nelle colture trattate, dopo l'ultima applicazione dei pesticidi, senza rischi per la propria salute è riportata nell'etichetta dei singoli formulati, in base al D.Lgs. 194/95 e smi.

In sintesi, il problema dei tempi di rientro, dipende essenzialmente da differenti meccanismi:

- a) proprietà tossicologiche delle sostanze usate;
- b) modalità di esposizione dei lavoratori;
- c) processo di degradazione della sostanza usata per il trattamento.

Il rischio derivante dal rientro in campo dopo trattamento, dipende in particolare dalla tossicità del prodotto usato, dai quantitativi di residui rimovibili, dall'estensione di cute in contatto con la vegetazione, dalla durata e frequenza del contatto, dalle abitudini lavorative e di igiene personale dell'agricoltore. La quantità di residuo rimovibile dipende: dal prodotto, dal tipo di coltura, e dalle condizioni ambientali¹².

¹¹ Maroni M, et al. *Gli antiparassitari: normativa, impieghi e strategie di prevenzione*. In: Foà V, Ambrosi L. *Med del Lav.*, Torino, UTET, II ed., 2003, p. 229-260.

¹² Ward MH, et al. *Proximity to crops and residential exposure to agricultural herbicides in Iowa*. *Environ Health Perspect.*, 2006, 114(6), p. 893-897.

CAPITOLO 4

I PIANI SANITARI NAZIONALI IN ITALIA ED EVIDENZE BASATE SULLA PREVENZIONE

4.1 Introduzione

La riforma sanitaria in Italia, istitutiva del Sistema Sanitario Nazionale (SSN), attraverso la Legge n. 833 del 23.12.1978, recepiva i nuovi orientamenti emergenti a livello internazionale “Salute XXI secolo” (OMS, 1977), ove si attribuisce alla prevenzione delle malattie, alla promozione della salute, alla salvaguardia della salubrità dell’ambiente naturale, di vita, di lavoro ed al superamento degli squilibri socio-economici, un ruolo fondamentale nella definizione degli obiettivi di salute. In pratica con l’art. 53 della Legge 833/78, si individuavano con i Piani Sanitari Nazionali triennali, le azioni di intervento da attuare per la difesa della salute.

A livello nazionale, il Piano Sanitario Nazionale (PSN) e il Piano Sanitario della Prevenzione (PSP), rappresentano gli strumenti attraverso i quale rilanciare, nel nostro Paese, una seria e convinta strategia di sviluppo salubre e sostenibile e, dunque, di reale promozione della salute, individuando innovativamente nella epidemiologia ambientale e nella comunicazione del rischio, i due terreni prioritari di integrazione tra ambiente e salute.

Pertanto caposaldo della prevenzione sanitaria, e quindi della difesa della salute è la salubrità ambientale dei luoghi di vita e di lavoro (*igiene ambientale*).

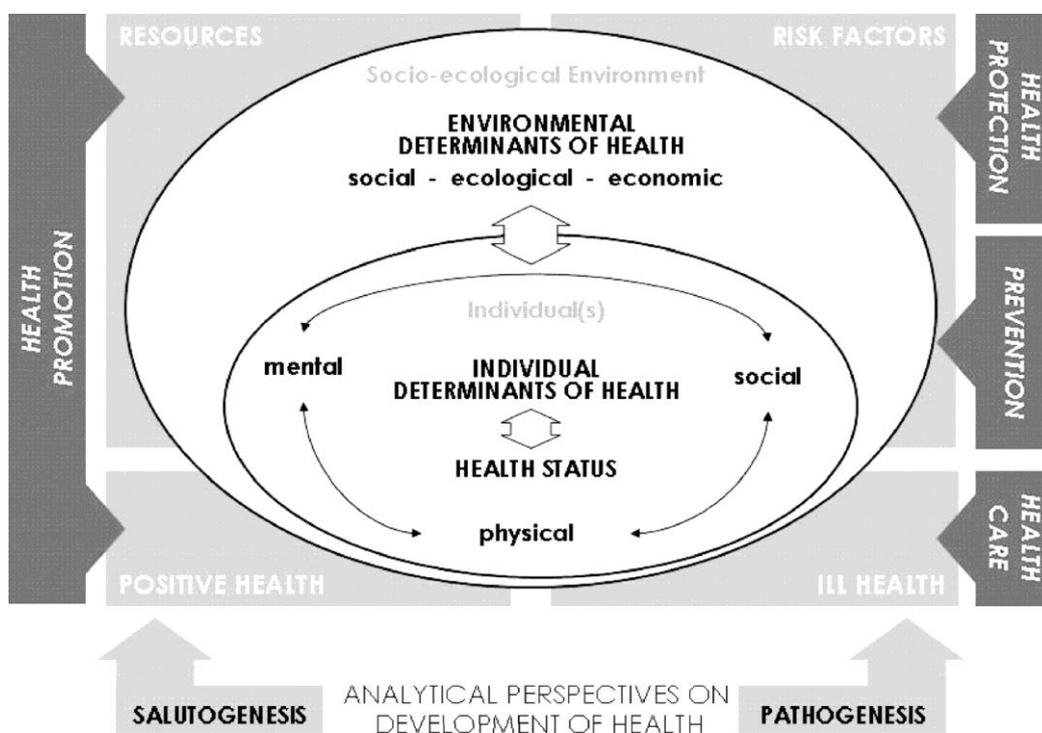
Sono passati molti anni e molta strada è stata fatta, attraverso punte avanzate di esperienze fattive di individuazione delle cause di rischio; mappature territoriali dei rischi ambientali; individuazione certa dei rapporti causa-effetto delle sostanze inquinanti; indagini serie e scientifiche di epidemiologia sanitaria ed ambientale.

In conclusione, è ormai cultura diffusa, soprattutto in Europa, che la tutela della salute, passi necessariamente attraverso la tutela dell’ambiente.

4.2 Salute e Ambiente

In questi ultimi decenni, si è affermata sempre di più, la consapevolezza della gravità del rischio sanitario correlato alle matrici ambientali e la necessità di considerare congiuntamente i problemi relativi allo stato di salute della popolazione, ed alla qualità dell'ambiente in cui vivono. In effetti, i danni all'ambiente, sono aumentati in modo costante nel corso degli ultimi anni, con gravi ripercussioni sulla salute, attraverso un incremento delle cause di morbosità e mortalità della popolazione e conseguentemente gravi ricadute sulla collettività non solo sociosanitarie, ma anche economiche.

EUHPID Health Development Model: public health intervention approaches¹



Per questo l'Ambiente e la Salute, costituiscono un binomio inscindibile: tutti i fattori ambientali che interagiscono e influenzano la salute e il benessere dell'individuo o della collettività, richiedono un approccio globale ed integrato.

Il concetto di "Ambiente e Salute" ("Environmental Health"), secondo la definizione fornita dall'O.M.S. nel 1993, "si riferisce, alla teoria e alla pratica di

¹ Bauer G, et al. *The EUHPID Health Development Model for the classification of public health indicators.* Health Promot Int., 2006; 21(2), p. 153-159.

valutare, correggere, controllare e prevenire quei fattori ambientali che possono potenzialmente produrre effetti avversi sulla salute, della generazione presente e futura”.

In Italia, tale concetto, viene sancito con il DPCM 29.09.2001 “Definizione dei livelli essenziali di assistenza”, ove al punto 1.2 “Tutela della collettività e dei singoli dai rischi sanitari degli ambienti di vita”, stabilisce le seguenti priorità:

- valutazione dell’impatto sulla salute umana, dei fattori di nocività, pericolosità e di deterioramento negli ambienti di vita e indicazione delle misure idonee alla tutela della salute umana;
- vigilanza e controllo delle sostanze, dei preparati pericolosi e sulla loro etichettatura.

4.3 Il Piano Sanitario Nazionale 2011-2013

4.3.1 Il Sistema Sanitario Nazionale nel contesto Europeo e Internazionale: la “Carta di Tallinn”

Come tutti i Paesi aderenti all’Organizzazione mondiale della sanità (OMS), anche l’Italia, si trova impegnata ad affrontare le principali sfide sanitarie, in un contesto di cambiamento demografico ed epidemiologico, di disparità socio-economiche che si ampliano, di risorse limitate, di sviluppo tecnologico e di aspettative crescenti.

Nel giugno 2008, l’Italia, ha approvato con tutti i Paesi aderenti all’OMS, la Carta di Tallinn, impegni assunti con le indicazioni fornite nell’attuale Piano sanitario nazionale, quale visione della salute, come contributo al benessere sociale e allo sviluppo economico.

A Tallinn, i Ministri della salute europei, hanno riconosciuto che una salute migliore, contribuisce al benessere sociale, attraverso il suo impatto positivo sullo sviluppo economico, sulla competitività e sulla produttività di ciascun Paese e che, pertanto, sistemi sanitari nazionali efficienti, contribuiscono allo sviluppo ed al benessere economico.

L’Italia, insieme a tutti i Paesi aderenti all’OMS, ha quindi dichiarato la propria convinzione che:

- investire in salute, equivale ad investire nello sviluppo umano, nel benessere sociale e nel benessere economico;

- i sistemi sanitari nazionali, vanno oltre l’assistenza sanitaria, includendo la prevenzione delle malattie, la promozione della salute, e tutti gli sforzi atti ad influenzare altri settori che intendono occuparsi di problemi di salute nelle loro politiche;
- i sistemi sanitari nazionali, devono dimostrare una buona performance per migliorare la salute e salvare vite umane.

4.3.2 Il Sistema Sanitario Nazionale nel contesto Europeo e Internazionale: esperienze internazionali

Il mutamento dei bisogni e della domanda assistenziale, dominati dalla prevalenza delle patologie cronico-degenerative, responsabili oggi di circa l’80% della mortalità nei Paesi della Regione europea dell’OMS (OMS, 2008), sono fondate su un’efficace ruolo dell’assistenza primaria e dalla prevenzione.

4.3.3 Il Piano Sanitario Nazionale 2011-2013: le linee prioritarie di sviluppo

Le scelte strategiche della politica sanitaria del prossimo triennio, in termini di opportunità e di vincoli, si caratterizzeranno fortemente verso:

- il miglioramento e potenziamento della prevenzione;
- la riorganizzazione delle cure primarie;
- la promozione e la diffusione nei servizi sanitari del governo clinico, della qualità e della sicurezza dei soggetti;
- il potenziamento dei sistemi di rete nazionali e sovraregionali (malattie rare, trapianti ecc.);
- la diffusione e il consolidamento dell’integrazione sociosanitaria;
- la promozione del ruolo del cittadino, delle associazioni nella gestione e nel controllo delle prestazioni del servizio sanitario;
- il miglioramento e la qualificazione del personale dei servizi sanitari.

Nell’ambito di queste scelte dovranno essere conseguiti obiettivi prioritari, come:

- la tutela e la cura delle persone più deboli: dai disabili agli anziani non autosufficienti, ai portatori di patologie psichiatriche, alle persone con dipendenza, favorendo anche la loro integrazione nella vita quotidiana.

4.3.4 Il Piano Sanitario Nazionale 2011-2013: le criticità da affrontare

a) I mutamenti demografici

L'analisi degli indicatori strutturali e di carico demografico, conferma il processo di invecchiamento della popolazione. Negli ultimi dieci anni, la popolazione è aumentata in termini assoluti di circa 3,5 milioni di abitanti, ma l'incremento maggiore (di circa 1,9 milioni di persone), si è osservato tra gli ultra sessantatrenni. Il processo di invecchiamento investe tutte le regioni d'Italia, ma più pesantemente le regioni centro-settentrionali.

b) I mutamenti epidemiologici

L'epidemiologia che descrive la salute degli italiani e le tendenze in corso, è attualmente dominata dalle patologie degli anziani (che includono soprattutto malattie cardiovascolari, tumori, malattie neurologiche), dalla ridotta natalità della popolazione italiana, dall'aumento continuo di condizioni cronico-degenerative che una volta insorte impongono assistenza sanitaria per il resto della vita, e quindi un costante incremento di spesa, dalla necessità di integrare assistenza sociale e sanitaria per un efficiente utilizzo delle risorse.

Studi recenti, condotti in Italia, a livello sia nazionale che locale, hanno mostrato, che la prevalenza annuale dei disturbi psicopatologici nella popolazione generale è del 7-8%.

Prevalenze elevate, si riscontrano, nella sempre più rappresentata fascia di età anziana e nelle donne. A fronte di elevati tassi di prevalenza, solo poche, tra le persone coinvolte, riceve un trattamento specialistico.

4.3.5 Il Piano Sanitario Nazionale 2011-2013: azioni per lo sviluppo del sistema

a) Rilanciare la prevenzione

La salute delle persone è largamente influenzata da fattori estranei al sistema sanitario, quali i determinanti sociali, economici, comportamentali ed ambientali, che possono causare diseguaglianze sistematiche nello stato di salute della popolazione.

La promozione e la tutela della salute collettiva ed individuale, e più in generale gli obiettivi di politica sanitaria e sociale, richiedono pertanto una integrazione delle politiche socio-sanitarie con le politiche relative, come ad es. la tutela

dell'ambiente, sia a livello centrale che territoriale e devono essere perseguiti con il coinvolgimento di tutti i soggetti della comunità locale: istituzionali, sociali e del mondo produttivo.

La concertazione diventa, quindi, una strategia che consente la valorizzazione dei diversi soggetti attivi nelle politiche sanitarie e sociali, ma anche e soprattutto, una condizione strutturale, che facilita l'incontro delle responsabilità e delle risorse disponibili nel territorio.

Pertanto, la salute è un bene collettivo da conquistare e tutelare, attraverso l'integrazione tra le azioni che competono alle Istituzioni ed alla società, ponendo attenzione non solo agli aspetti specificatamente sanitari.

Tenuto conto, che è ormai evidente, che la prevenzione esclusivamente sanitaria non è sufficiente, è necessario costruire una cultura condivisa in un sistema di rete in cui la "salute" diviene preoccupazione globale del Paese e non solo del sistema sanitario.

L'approccio intersettoriale, deve integrarsi con il consolidamento di un sistema fondato sulla comunicazione e sulla partecipazione dei professionisti della salute che, pur appartenenti ad unità operative diverse o a diversi livelli gestionali del SSN, concorrono al raggiungimento di obiettivi comuni, attraverso l'elaborazione ed attuazione di percorsi clinico-assistenziali condivisi tra territorio ed ospedale, ed attraverso l'attivazione di reti integrate tra prevenzione, assistenza di base (MMG e PLS), permettendo quindi di favorire scelte corrette in grado di promuovere e tutelare la salute ed il benessere.

Attuare strategie efficaci per ridurre questi fattori, potrà quindi prevenire gran parte delle malattie.

b) Le azioni per il controllo dei determinanti ambientali

I cittadini europei, esprimono preoccupazione per l'ambiente in cui vivono, per la propria salute e per la qualità della vita. Sei cittadini europei su dieci, ritengono "molto" probabile o "abbastanza" probabile che l'inquinamento ambientale, rappresenti un pericolo per la loro salute. Ritengono, inoltre, che l'ambiente debba essere considerato come uno dei motori dell'innovazione e le politiche di tutela dell'ambiente come un incentivo al progresso, piuttosto che un ostacolo per le prestazioni economiche.

Un riferimento evidente, dell'importanza attribuita all'impatto dell'ambiente sulla salute pubblica, si ritrova anche nel riesame della strategia dell'UE in materia di sviluppo sostenibile, approvato dal Consiglio EU nel giugno 2006. Il risparmio dei costi, già ottenuto o che si otterrà, nel settore sanitario, con l'adozione di interventi adeguati di prevenzione, anche verso i fattori di rischio ambientale, può contribuire a realizzare gli obiettivi.

L'OMS Europa ha pubblicato, in occasione della recente Conferenza Ambiente e Salute di Parma (10-12 marzo 2010), una valutazione completa dell'andamento della salute ambientale nella Regione europea negli ultimi vent'anni, e una revisione delle ineguaglianze nell'esposizione ai rischi ambientali. Nel complesso, pur osservando andamenti positivi, le indagini dell'OMS rilevano ancora numerose criticità e disuguaglianze, nella distribuzione sociale dell'esposizione ai determinanti ambientali nonché nelle morti e nelle malattie correlate.

Dopo una riduzione sostanziale dell'inquinamento dell'aria outdoor, nella maggior parte della Regione nell'ultima decade degli anni '90, il progresso è stato minimo.

Alla luce degli indirizzi europei ed internazionali, la politica sanitaria italiana, deve fissare alcuni obiettivi di grande scala, sui temi ambiente e salute che devono trovare continuità, nel sistema delle Regioni e degli Enti locali, secondo il principio di sussidiarietà, prevedendo l'inserimento delle priorità di salute nelle politiche e norme settoriali, su: aria, acqua, rifiuti e suolo, cambiamenti climatici, sicurezza alimentare e inquinanti chimici, adottare una politica integrata dei prodotti (eliminando le emissioni o l'uso di sostanze pericolose nei prodotti e nei processi di produzione).

A tal fine, occorre attivare concretamente sinergie e coordinamento tra ARPA, Province, Comuni e Dipartimenti di Prevenzione delle ASL, e implementare le attività di sorveglianza e monitoraggio epidemiologico nelle città italiane, come strumento di *advocacy* per le azioni nei confronti di altre amministrazioni. La salute, delle fasce più vulnerabili della popolazione, deve costituire un obiettivo privilegiato, su cui fondare le misure di prevenzione e di gestione dei rischi, in tutti gli ambiti considerati.

c) Ambiente e catena alimentare

La presenza, sempre più distribuita sul territorio, di aree a forte antropizzazione, a cui si aggiungono gli specifici siti di interesse nazionale (poli industriali a rischio rilevante), individuati sulla base del forte impatto ambientale, ha evidenti risvolti sulla sicurezza chimica della catena alimentare. La presenza di contaminanti ambientali nell'alimento, è regolamentata a livello comunitario, e deve essere costantemente monitorata. Laddove si identifica una situazione di contaminazione, essa va affrontata a livello territoriale, con misure volte non solo a impedire il consumo di alimenti non conformi, ma soprattutto attraverso la rimozione, o almeno il contenimento delle cause contaminanti.

Obiettivi nel triennio:

- potenziare ed ampliare uno studio sulla “valutazione della presenza di alcuni contaminanti ambientali tossici e persistenti d’interesse emergente, attraverso l’utilizzo di bioindicatori zootecnici”, che divenga strumento per identificare il contesto dell’esposizione, gli eventuali “punti critici” di contaminazione ed i luoghi ad alto rischio ambientale, con ripercussioni sulla sicurezza alimentare;
- effettuare un piano di monitoraggio nazionale, su contaminanti ambientali nei prodotti di origine animale, e una razionalizzazione nelle attività di controllo dei residui, nei prodotti di origine vegetale.

d) Health Impact Assessment

L'Health Impact Assessment (HIA), o valutazione d'impatto sulla salute (VIS), è un insieme di procedure e metodiche che permettono di determinare gli effetti positivi e negativi, prodotti sullo stato di salute della popolazione, da politiche, programmi e progetti, in settori anche non sanitari (es. ambiente, urbanistica, trasporti, viabilità). Esso, deve pertanto analizzare sia le conseguenze dirette sul benessere della collettività, che quelle indirette, derivanti cioè, da una modifica dei molteplici determinanti di salute.

La Sanità Pubblica, si ritrova a dover parzialmente spostare l’oggetto della sua osservazione, dalle cause dirette di malattia e salute, ad una più mirata valutazione delle politiche che, anche indirettamente, influenzano quelle cause dirette: l’inquinamento atmosferico, le politiche di trasporto urbano, gli stili di vita, le

politiche economiche, le relazioni sociali e il loro impatto sulla salute. Ma tale passaggio non può essere certo rapido ed immediato.

In sintesi, bisognerebbe aiutare chi di competenza, che non necessariamente debbano essere esperti in tutte le materie, ad avere un documento e dati comuni, che li aiutino a fare le scelte giuste, tenendo sempre l'obiettivo principale la tutela della salute.

e) Soggetti ad alto grado di tutela

Nell'ambito delle patologie, tutte ugualmente meritevoli di tutela, ce ne sono alcune che rappresentano un problema di grande rilevanza medica e sociale, in quanto:

- generano situazioni di disabilità gravissima e non emendabile ad andamento cronico, di cui spesso non sono noti i meccanismi patogenetici che le scatenano, né si dispone di mezzi terapeutici capaci di debellarle o, almeno, di arrestarne il processo degenerativo;
- hanno un devastante impatto psicologico ed operativo sulle famiglie chiamate a farsi carico di oneri anche economici, inversamente proporzionali all'offerta assistenziale del servizio pubblico;
- sono responsabili di elevati costi complessivi di assistenza, contenibili solo attraverso una risposta del sistema sanitario coordinata ed efficiente.

Le patologie in questione, riguardano in particolare:

- soggetti in stato vegetativo e di minima coscienza;
- soggetti affetti da malattie neurologiche degenerative ed invalidanti;
- soggetti affetti da demenza.

f) Età senile

La promozione della salute, la prevenzione di patologie specifiche, e la riduzione della disabilità e dello svantaggio sociale che ne deriva, sono obiettivi di salute prioritari, in una società che invecchia.

Un primo obiettivo, è il *raggiungimento della vecchiaia in buona salute*, e cioè priva di effetti tipici delle malattie cronico-degenerative, ciò richiede efficaci strategie di prevenzione che vadano ad agire tanto sul contesto sociale quanto sul *modus vivendi* della persona.

I punti cardine della strategia d'intervento, sono:

- la partecipazione degli anziani alla vita sociale;
- l’equità di accesso ai servizi;
- l’appropriatezza e flessibilità della rete dei servizi sociosanitari;
- la promozione di stili di vita positivi;
- la prevenzione delle principali patologie;
- il trattamento specialistico delle patologie a rischio di perdita dell’autonomia;
- la riabilitazione per il recupero e il mantenimento della massima autonomia possibile;
- il sostegno per convivere attivamente con la cronicità;
- la promozione dell’integrazione tra servizi sanitari e sociali;
- la promozione della ricerca sull’invecchiamento e sulle malattie croniche invalidanti;
- la formazione degli operatori specifica e interdisciplinare mirata alla qualità delle prestazioni ed alla umanizzazione dei servizi.

4.4 Il Piano Sanitario della Prevenzione 2010-2012

4.4.1 Principi della prevenzione

Nel corso degli anni, sono subentrate differenti variabili, che impattano sulla salute della popolazione (la massiccia immissione in ambiente di nuove sostanze chimiche, allergizzanti e tossiche; l’incremento esponenziale dell’inquinamento atmosferico ecc.); non va poi dimenticato come un evento di per sé positivo, come quello dell’allungamento della vita, abbia generato un fenomeno paradossale che è l’incremento del numero di soggetti fragili e portatori di cronicità.

Inoltre, l’attuale quadro epidemiologico caratterizzato da una prevalenza delle malattie cronico-degenerative, richiedono di focalizzare l’interesse sulla promozione della salute. Questa si fonda: sullo studio dei determinanti di salute; su programmi di sanità pubblica di efficacia provata (EBP); e sulla collaborazione del sistema sanitario con altri settori della società (associazioni, ecc.), al fine di sviluppare politiche più favorevoli alla salute.

Infatti, rispetto agli interventi di assistenza, diagnosi e cura, che riguardano la singola persona; la “prevenzione” ha una valenza ulteriore: si rivolge infatti alla collettività.

Va annotato che l'approvazione del programma "Guadagnare salute" con il DPCM 4 maggio 2007, ha introdotto un grande cambiamento nelle strategie di prevenzione: è stato infatti, formalmente fatto proprio dal Governo italiano, un concetto di salute come bene collettivo, da promuovere e mantenere attraverso l'integrazione tra le azioni che competono alla collettività, e quelle che sono responsabilità dei singoli individui. "Guadagnare salute" si propone come grande intervento di salute pubblica, che affronta in maniera integrata il contrasto ai principali fattori di rischio, ponendo attenzione non solo agli aspetti specificamente sanitari, ma anche ai determinanti ambientali, sociali ed economici della salute, in particolare a quelli che maggiormente influenzano, le scelte ed i comportamenti individuali.

Pertanto è assolutamente necessario e ragionevole, ricorrere a strumenti che consentano di definire meglio le priorità, individuando i problemi di salute nei confronti dei quali, allo stato delle conoscenze, la prevenzione possa mettere in campo interventi atti a contrastare i fattori di rischio, e a potenziare i determinanti positivi.

In definitiva questi interventi sono da implementare nell'ambito del Piano Nazionale della Prevenzione (PNP), tenendo conto della prospettiva di un progressivo invecchiamento della popolazione, e di una prevalenza crescente con l'età di malattie che generalmente non guariscono, ma che al contrario, accompagnano la persona per il resto dell'esistenza, condizionandone significativamente la qualità della vita, come individuo e come parte integrante della comunità.

4.4.2 Metodi e approccio del PNP

Un processo simile, si sta compiendo nella prevenzione collettiva e nella sanità pubblica (Evidence based prevention o Evidence Based Public Health), tuttavia con maggior lentezza, dovuta ad alcune caratteristiche oggettive della sanità pubblica, prima fra tutte l'inevitabile intervallo tra un intervento di carattere preventivo e suoi effetti sulla salute della popolazione. In assenza di evidenze, è necessario investire anche nell'acquisizione di nuovi dati che permettano la valutazione delle pratiche proposte o correnti. Il presente PNP, assume la necessità che le linee operative individuate, debbano da una parte essere fondate,

per quanto possibile, su evidenze scientifiche già acquisite e riportate in letteratura, dall'altra sottoporsi al vaglio della valutazione di efficacia, non solo di processo ma anche di risultato. La sfida è dunque, quella di una programmazione delle attività ben motivata, in funzione dell'efficacia misurabile con risultati.

Per tale motivo il presente PNP, è stato predisposto a partire da alcuni indicatori sintetici dello stato di salute, così da:

- definire i criteri per una graduazione dei rischi/effetti rilevati;
- individuare tutti gli ambiti di intervento prioritari: prevenzione e controllo delle patologie; prevenzione negli ambienti di vita e di lavoro; prevenzione da fattori di rischio ambientali, promozione della salute.

Il PNP sottolinea anche l'importanza di valorizzare l'esperienza acquisita con il precedente PNP, per cui è fondamentale basare la programmazione, su una “gestione della conoscenza”.

Questa esigenza, si è concretizzata in particolare, attraverso:

- lo sforzo di attingere dalle conoscenze di “evidence based prevention” (EBP), per un concreto utilizzo nei piani operativi regionali (per es. diffusione dei programmi di screening basati su evidenze);
- l'implementazione di strumenti di conoscenza di dati, relativi ai determinanti per la salute (per es. carta del rischio, sorveglianza PASSI, progetto OKkio alla salute);
- la definizione, diffusione e promozione dell'utilizzo di dati epidemiologici organizzati (es.: adeguamento del sistema informativo delle malattie infettive, Flussi INAIL, Archivio infortuni mortali, coordinamento Registri Tumori);
- nella valutazione quantitativa e qualitativa dei risultati raggiunti (es.: coperture vaccinali, percentuali di adesione agli screening ecc.), come strumento per la riprogrammazione. “In tale quadro, appaiono rilevanti le attività di monitoraggio e valutazione dell'avanzamento del PNP (in base a criteri condivisi), anche al fine di utilizzare i dati e gli indicatori raccolti, per innescare un circolo virtuoso che adegui sempre più gli interventi ai contesti cui sono diretti”.

Infine, è stato recentemente pubblicato un decreto ministeriale che regola l'attuazione delle linee di supporto centrali al PNP 2010-2012 (D.M. 4/8/2011,

Gazzetta Ufficiale n. 254 del 31/10/2011). In particolare si sottolineano alcuni ambiti tematici prioritari, nell'ambito del "Quadro Strategico", al fine di:

- promuovere l'approfondimento e la diffusione della prevenzione basata su prove di efficacia (EBP);
- mettere a disposizione strumenti per la sorveglianza, vera guida all'azione e componente essenziale della sanità pubblica, che serve a valutare i rischi di salute, i bisogni e possibilmente l'impatto degli interventi.

4.4.3 La prevenzione nella popolazione a rischio: le malattie neurologiche

Gli studi epidemiologici, hanno evidenziato un aumento significativo delle malattie neurologiche, come causa di morte e di invalidità nel mondo, anche in relazione ai processi di transizione demografica. In questo contesto, particolare rilievo assumono le demenze.

Tali patologie, ed in particolare la "demenza di Alzheimer" che è la più diffusa, hanno un impatto sempre maggiore sulla salute, innanzitutto a causa del progressivo invecchiamento della popolazione, dal momento che il principale fattore di rischio associato alla loro insorgenza è proprio l'età.

La consapevolezza del peso e dell'importanza del fenomeno delle demenze, con le sue implicazioni, è attualmente anche al centro dell'interesse e delle attività promosse dall'Unione Europea, che ne ha fatto oggetto di una serie di raccomandazioni ed iniziative per tutti i Paesi membri.

Un serio approccio, alla prevenzione e alla gestione delle patologie neurologiche (incluse quelle neurodegenerative), deve essere fatto perchè pur coinvolgendo una quota numericamente limitata della popolazione, insorgono anche in età giovane, con pesanti ricadute in termini di disabilità.

4.4.4 La prevenzione delle complicanze e recidive di malattia: la sfida della cronicità

Oggi più che mai, l'allungamento della vita media, rappresenta "un trionfo e una sfida" per la nostra società. Esso è insieme, parte e conseguenza di un più ampio processo di sviluppo e di trasformazione, legato a conquiste ottenute in campo medico, sociale, economico, politico e culturale.

D'altra parte, ad un allungamento della vita, non sempre corrisponde un effettivo miglioramento della sua qualità: con l'aumento dell'età, cresce il problema della mancata autosufficienza, aggravata dalla presenza di pluri-patologie.

4.5 Le prove di efficacia in Sanità Pubblica

Secondo la definizione, tratta dall'*Health Promotion Glossary* (1998): “La promozione della salute, é il processo che consente alle persone, di acquisire un maggior controllo dei determinanti della propria salute e di migliorarla”.

In passato, la scelta degli interventi da effettuare in Sanità Pubblica, è stata dettata troppo spesso dalla necessità di trovare soluzioni a breve termine per problemi contingenti². Oggi, in Sanità Pubblica, sempre più spesso ci si serve dell'applicazione del ragionamento scientifico, incluso l'uso sistematico di dati, dei sistemi di informazione e l'uso appropriato di modelli di pianificazione. La Evidence Based Public Health (EBPH) è quel processo finalizzato al miglioramento delle condizioni di salute della popolazione, basato sull'integrazione tra l'adozione di interventi basati su prove di efficacia e le preferenze espresse dalla comunità³.

Il merito della *evidence based practice*, è di aver unito la cultura “clinica” delle revisioni sistematiche di letteratura e di aver preso in considerazione l'ambiente, lo scenario e le sue influenze sull'intervento stesso, e quindi sugli outcome di salute raggiunti. In altre parole, i criteri per raggiungere la miglior evidenza possibile, prendono in considerazione, da un lato la letteratura disponibile (valutata attraverso una griglia di valutazione, che pesa il disegno dello studio, la grandezza del campione e i risultati), e dall'altro, prende in considerazione il contesto (in questo studio quantità, qualità e specificità dei pesticidi a cui si è esposti, tipologia di attività professionale, ecc..) all'interno del quale l'intervento ha dato quel risultato.

Prendere in considerazione il contesto, significa d'altro canto, condurre valutazioni a livelli inconsueti (rispetto a quelli della pratica clinica), su cui si gioca appunto l'efficacia del metodo.

² Brownson RC, et al. *Evidence-based Public health*. Oxford University press. 2003.

³ Kohatsu ND, et al. Evidence-based public health: an evolving concept. *Am J Prev Med.*, 2004; 27(5), p. 417-421.

Il merito della “*evidence based practice*”, è proprio quello di pesare le diverse informazioni, in modo da trarre evidenze che non rispondono solo a bisogni strettamente tecnici o biomedici, ma anche a tutte le istanze sociali collegate ad un intervento di comunità. Siamo decisamente nel campo della effectiveness, ossia della capacità di un programma studiato a tavolino, di essere efficace nel contesto in cui viene calato⁴.

4.5.1 Evidence Based Prevention (EBP)

Le iniziative di Sanità Pubblica basate su prove di efficacia, hanno progressivamente guadagnato slancio negli ultimi dieci anni, da quando è nata, nel settembre 1999, l’iniziativa della Evidence Based Prevention (EBP), un movimento di operatori sanitari che cooperano per cambiare la pratica della prevenzione, sforzandosi di migliorarla, al fine di renderla sempre più utile, per la salute della popolazione⁵. L’iniziativa EBP, intende arricchire la prevenzione di tutti gli interventi, a seguito di studi basati su metodologie scientifiche, cui è stata dimostrata una significatività dello studio⁶.

L’OMS invita gli Stati Membri, ad “adottare un approccio di “*evidence based*”, alle strategie e alle pratiche di promozione della salute, usando metodologie quantitative e qualitative.

La questione, evidentemente assai complessa, richiama la necessità di discutere i due concetti chiave: quello di “efficacia” (in promozione della salute) e quello di “evidenza di efficacia”. In generale, l’efficacia attiene al conseguimento degli obiettivi del progetto/intervento, mentre l’evidenza, attiene al processo attraverso il quale tale efficacia può essere documentata.

Nello specifico, l’efficacia/inefficacia di un intervento, potrebbero non risultare evidenti, a causa della mancanza di un processo di elaborazione delle informazioni su di esso, come anche per la mancanza di comunicazione degli esiti di tale processo.

⁴ Rychetnik L, Frommer M. *A schema for evaluating evidence on public health interventions*. Version 4. National Public Health Partnership. Melbourne, 2002.

⁵ Muir Gray JA. *Evidence-based healthcare and Public Health*. How to make decisions about health services and public health. Churchill Livingstone, 2008.

⁶ Elshaug AG, et al. *Exploring policy-makers’ perspectives on disinvestment from ineffective healthcare practices*. Int J Technol Assess Health Care. 2008; 24(1), p. 1-9.

Il problema della definizione dell'efficacia di un intervento, deve essere affrontata inoltre, tenendo in considerazione, il fatto che, ci collochiamo esplicitamente nel contesto operativo dei servizi di sanità pubblica, e non in un ambito di pura ricerca. Da questo punto di vista, la questione dell'efficacia, va ulteriormente articolata, mediante la definizione in termini di “*efficacy*” e “*effectiveness*” che appartengono alla letteratura specifica sulla valutazione, in grado di delineare il campo d'azione e le strategie operative.

4.5.2 Valutazione dell'efficacia teorica (Efficacy)

Il problema della valutazione dell'efficacia teorica degli interventi, è oggi uno dei temi più spinosi e dibattuti, nel settore della promozione della salute. La natura multidisciplinare e contestuale di tale settore, impedisce la possibilità che la valutazione dell'efficacia, si basi su un singolo approccio ritenuto lo *standard* di riferimento, come accade nella tradizione scientifica biomedica con il Trial Clinico Randomizzato. Infatti, non c'è uno *standard* per la valutazione in promozione della salute. Rootman⁷, sottolinea come alla base di un approccio promozionale alla salute, debbano esservi alcuni “principi guida”, alla luce dei quali stabilire la coerenza di ogni successiva scelta metodologica, strumentale e organizzativa relativa alla valutazione.

4.5.2 Valutazione delle evidenze di un intervento

L'evidenza (*evidence*), è un fatto o un dato (o un complesso di) che è, o può essere usato per prendere una decisione, esprimere un giudizio, risolvere un problema. Sackett, in un suo contributo, definisce la evidence-based medicine (EBM), come “l'uso coscienzioso, esplicito e giudizioso delle migliori evidenze disponibili, per prendere decisioni sulla cura dei singoli soggetti”.

Lo stesso Sackett ha declinato la definizione di *evidence*, anche al campo della sanità pubblica intendendola come “l'uso coscienzioso, esplicito e giudizioso delle migliori evidenze disponibili per prendere decisioni nelle attività quotidiane di sanità pubblica, nel processo di sviluppo delle politiche e dei programmi di sanità pubblica”⁸.

⁷ Rootman I. *Introduction to the book, in Evaluation in Health Promotion. Part 1. Introduction and framework*. WHO Regional Publications European. 2001; 92, 5.

⁸ Sackett DL, et al. *Evidence based medicine: what it is and what it isn't*. BMJ, 1996; 312(7023), p. 71-72.

Il problema dell'evidenza, e delle azioni basate sull'evidenza sta ancora suscitando una considerevole discussione nel campo della sanità pubblica, e della promozione della salute nello specifico.

Allo stato attuale, le caratteristiche ed i requisiti, su cui si costruisce un'evidenza, possono essere due⁹:

1. come base dell'evidenza, non può essere invocata una gerarchia di fonti (ovvero modelli di studio che producono più evidenza di altri, es. TCR vs. altri), ma quello che Tones definisce *Judicial principle*, ovvero: il principio attraverso il quale si produce un'evidenza, che condurrebbe una giuria a impegnarsi in una decisione anche quando non sia disponibile il 100% della prova. [Come in una sede giudiziaria la decisione di ciò che è evidente e conduce a un'azione è il frutto di una molteplicità di fonti, per cui determinare il valore dell'evidenza è il frutto di un processo interpretativo.]
2. in secondo luogo l'evidenza è il prodotto di un mix tra sperimentazione, osservazione, riflessione teoretica. [Come molte teorie determinanti nella storia della scienza e dell'umanità, la misura delle loro conclusioni è giunta solo dopo anni di continue e ripetute osservazioni.]

La natura multidisciplinare e “*context based*” della promozione della salute, si oppone alla possibilità che vi sia un'unica strategia (disciplinare), per raggiungere l'evidenza. E' innegabile tuttavia che molti sforzi, siano stati e siano tuttora rivolti, a stabilire l'evidenza di efficacia di un programma. I risultati di questi sforzi, trovano la loro sede in contributi di alto rilievo, prodotti da istituzioni scientifiche rilevanti a livello internazionale (Center for Disease Control, Cochrane Collaboration).

⁹ Mc Queen DV, Anderson LM. *What counts as evidence: issues and debates in Evaluation in Health Promotion. Part 2 Perspectives*. WHO Regional Publications European. 2001; 92, 5.

CAPITOLO 5

META-ANALISI DEGLI STUDI DI ASSOCIAZIONE TRA PARAQUAT E MORBO DI PARKINSON

5.1 Obiettivi dello studio

Scopo dello studio è la dimostrazione attraverso l'uso della meta-analisi che l'esposizione alla sostanza chimica "paraquat" comporta un alto rischio di sviluppare la malattia di Parkinson.

Contrariamente a quanto disciplinato in Europa, ove del "paraquat" è stato revocato sia l'uso che l'immissione in commercio, in altri paesi del continente, invece, specie in quelli in via di sviluppo, risulta essere largamente utilizzato soprattutto in agricoltura.

Partendo da questi presupposti, con questa revisione sistematica si è voluto dimostrare, da una parte, il possibile rischio di malattia di Parkinson fra i soggetti esposti a questo pesticida e, dall'altra, approfondire la possibilità che la meta-analisi, metodo statistico per le revisioni sistematiche, principalmente usato negli studi sperimentali, possa essere considerato uno strumento utile anche negli studi più comunemente utilizzati nella medicina del lavoro, ovvero negli studi osservazionali. Infine, si è voluto confrontare i risultati di diversi studi caso-controllo in questo ambito, utilizzando come metodo di studio la meta-analisi, e valutare poi criticamente i risultati ottenuti.

Gli studi epidemiologici caso-controllo condotti negli ultimi venti anni sulla malattia di Parkinson hanno permesso di identificare, tra i principali fattori di rischio, l'esposizione occupazionale ai pesticidi e, tra i fattori protettivi, l'esposizione a fumo di sigaretta ed l'assunzione di caffeina^{1,2,3,4}.

¹ Tanner CM, et al. *Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study*. Arch Neurol., 2009; 66(9), p. 1106-1113.

² Richardson JR, et al. *Elevated serum pesticide levels and risk of Parkinson disease*. Arch Neurol., 2009; 66(7), p. 870-875.

³ Mayeux R, et al. *Smoking and Parkinson's disease*. Mov Disord., 1994; 9(2), p. 207-212.

⁴ Mayeux R. *Epidemiology of neurodegeneration*. Annu Rev Neurosci., 2003; 26, p. 81-104.

Come già ampiamente descritto nel capitolo 2, l'epidemia di parkinsonismi osservata agli inizi degli anni ottanta in una comunità di tossicodipendenti californiani ha permesso di identificare la più potente tossina parkinsonigena attualmente conosciuta, l'MPTP (1-metil 4-fenil 1,2,3,6-tetraidropiridina). Questa sostanza, prodotta in laboratorio, era presente come contaminante nelle dosi di eroina vendute per alcuni mesi in California, ed ha una somiglianza strutturale con uno dei più diffusi erbicidi, il paraquat. Questa osservazione ha spinto i ricercatori ad indagare il ruolo dell'esposizione occupazionale ai pesticidi nell'eziopatogenesi del Parkinson.

A partire dal 1990, sono stati condotti fino ad oggi all'incirca quaranta studi caso-controllo. La maggior parte di quelli effettuati negli ultimi vent'anni raggiungono un buono standard di qualità, e mostrano un'associazione statisticamente significativa tra l'esposizione a pesticidi e l'insorgenza della malattia. La variabilità di questa associazione, comunque, può essere attribuita alla selezione dei casi e dei controlli, alla numerosità del campione, alla valutazione dell'esposizione (tipo di questionario utilizzato, uso di matrici esposizioni-occupazioni, ecc.), al tipo di analisi statistica effettuata, al controllo di possibili fattori confondenti (sesso, età, fumo di sigaretta). Nonostante questa mole di dati, non si è ancora riusciti a dimostrare con certezza un nesso causale con qualche composto chimico presente nella categoria dei pesticidi, anche se che tale associazione sembra molto forte, poiché è stata osservata da autori diversi, in tempi e luoghi differenti.

L'identificazione e la valutazione di ogni fattore di rischio si ottiene mediante il confronto con una popolazione di controllo, che includa soggetti sani o non affetti dalla patologia in studio, con caratteristiche identiche o simili ai malati. Gli studi analitici, comprendono studi caso-controllo di tipo retrospettivo.

L'interpretazione dei risultati ottenuti da studi epidemiologici dipende dalla validità e dall'affidabilità delle misure effettuate.

5.2 Concetti basilari del disegno dello studio

Obiettivo di uno studio di epidemiologia ambientale è valutare se un'esposizione ambientale ha un effetto sulla salute. Questo obiettivo si può raggiungere confrontando l'occorrenza degli effetti sulla salute negli individui che sono stati

soggetti a differenti livelli di esposizione ed in particolare, confrontando gli effetti osservati negli individui esposti con quelli nei non esposti (o nei meno esposti). Il risultato di questo confronto viene quantificato calcolando una misura di effetto.

I disegni dello studio possono differenziarsi a seconda che si utilizzi l'intera informazione relativa all'esperienza condotta nel periodo a rischio dalle persone che compongono la popolazione in studio (studi di coorte), oppure paragonando le persone che presentano la malattia (i casi) con le persone che non la presentano, selezionate come campione rappresentativo dell'esperienza della popolazione base che ha generato i casi (studi caso-controllo).

5.3 Gli studi osservazionali (di coorte, trasversale, caso-controllo)

Per *studio osservazionale*, si intende uno studio eziologico o di efficacia che usa dati, a partire da una base esistente (cross-sectional), da una serie di casi (case-control), o da un disegno con controlli storici (cohort study).

a) Studio di coorte o longitudinale (*cohort study*).

È uno studio in cui gruppi di persone sottoposte a trattamenti diversi o a "esposizioni" diverse (ad esempio con diverse abitudini alimentari o rischi ambientali) vengono seguiti nel tempo per accertare in che misura vanno incontro a esiti diversi. Si contrappone per direzione dell'indagine allo studio caso-controllo, in cui si parte dall'effetto per risalire alle possibili cause.

b) Studio trasversale o di prevalenza (*prevalence study* o *cross-sectional study*).

È uno studio in cui un campione viene osservato in un singolo punto nel tempo, ma non è mai utilizzato per studiare l'efficacia di un trattamento e ha grossi limiti di valutazione sul ruolo di possibili fattori di rischio. Lo scopo fondamentale, è quello di stimare l'entità di un fenomeno, ad esempio la prevalenza di una malattia o le opinioni sui servizi ricevuti.

c) Studio caso-controllo (*case-control study*).

Questo tipo di studio, oggetto della presente tesi sperimentale, esamina l'associazione tra esposizione ed esito sanitario, confrontando i *casi*, gli individui che sviluppano l'esito, e i *controlli*, che sono un campione della stessa popolazione, fonte da cui sono tratti i casi.

I controlli sono generalmente individui simili ai casi, in termini di caratteristiche di rischio, ma che non hanno sviluppato l'esito sanitario. Negli studi caso-controllo, il ricercatore determina quale è stato il livello di esposizione in passato dei casi e dei controlli, esaminando le registrazioni esistenti, e/o le informazioni dai questionari.

L'efficienza dello studio caso-controllo deriva dal fatto che non è necessario aspettare il trascorrere del periodo di induzione fino all'instaurarsi di una patologia cronica, così come è relativamente limitato il costo della misurazione dell'esposizione nei casi e nei controlli.

Infatti, tali studi caso-controllo sono stati ampiamente usati per studiare il ruolo dei fattori ambientali nello sviluppo di diversi tipi di tumori particolarmente rari.

Talora negli studi caso-controllo si procede all'appaiamento (*matching*); in pratica, ogni caso viene appaiato con uno o più controlli che abbiano le sue stesse caratteristiche (stesso sesso, stessa residenza, età simile), in modo da rendere più confrontabili i due gruppi. In uno studio caso-controllo, a differenza che in studio di coorte, non è possibile calcolare il *rischio attribuibile* e il *rischio relativo*. È però possibile calcolare l'*odds ratio*, che rappresenta spesso una buona approssimazione del rischio relativo.

Negli studi caso-controllo, la misura del rischio relativo è il rapporto tra gli odds di esposizione (*exposure odds ratio*), e precisamente è il rapporto tra l'odds di esposizione nel gruppo dei casi (a/b) e l'odds di esposizione nel gruppo dei controlli (c/d). L'ipotesi che l'odds ratio sia significativamente diverso dal valore nullo, valore pari ad assenza di rischio (1,00), può essere testato con il I^2 (I-squared) di Mantel-Haenszel⁵.

L'intervallo di confidenza al 95% circa per l'odds ratio si può calcolare usando l'approccio del test di base.

5.3.1 Disegno dello studio caso-controllo

I passi principali, utili nella conduzione di uno studio caso-controllo, sono:

- stabilire la definizione di caso;
- stabilire i criteri per la popolazione in studio;

⁵ Mantel N, Haenszel W. *Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease*. J Natl Cancer Inst., 1959; 22(4), p. 719-748.

- identificare i requisiti di campionamento per la selezione dei casi;
- identificare i requisiti di campionamento per selezione dei controlli;
- valutare l'esposizione pregressa e altre caratteristiche rilevanti per casi e controlli;
- confrontare l'esposizione pregressa per casi e controlli, al fine di stimare l'associazione tra esposizione ed esito sanitario.

Se i casi comprendono tutti quegli individui, entro una popolazione definita, che sviluppano la malattia, il miglior gruppo di controllo sarà, in generale, un campione di individui della stessa popolazione fonte dei casi.

5.3.2 Punti di forza e limitazioni

Il disegno caso-controllo, come già accennato, è efficiente nello studio di patologie rare, specialmente quelle che presentano un lungo periodo di induzione, e la selezione dei soggetti in studio sulla base di un esito sanitario, permette al ricercatore di poter analizzare il ruolo giocato dai molteplici fattori ambientali.

Gli studi caso-controllo sono anche vantaggiosi per studiare popolazioni di tipo dinamico, che potrebbero rivelarsi difficili da seguire utilizzando uno studio di coorte.

Due dei principali svantaggi degli studi caso-controllo sono dovuti al fatto che non è semplice individuare una corretta popolazione di controllo e che si possono introdurre grandi distorsioni (*bias*) nel classificare l'esposizione, dal momento che essa è attribuita successivamente all'instaurarsi della patologia.

Un altro tipo di problema riguarda il ricordo dell'esposizione da parte dei soggetti in studio. Infatti, molti studi caso-controllo sono basati sul ricordo dei soggetti circa le pregresse esposizioni, ma i casi tendono a richiamare alla mente le passate esposizioni più dei controlli, che hanno meno motivazioni a ricordare tali circostanze. È anche possibile che la consapevolezza da parte dei ricercatori del gruppo di lavoro, circa le condizioni di malattia del soggetto, influenzi le loro modalità di misurazione o registrazione delle condizioni di esposizione.

Questi disegni sono stati usati a lungo nella valutazione dei programmi di ricerca nelle esposizioni che possono causare malattie⁶. Gli studi sui fattori di rischio

⁶ Ioannidis JP, Lau J. *Pooling research results: benefits and limitations of meta-analysis*. Jt Comm J Qual Improv., 1999; 25(9), p. 462-469.

generalmente non possono essere randomizzati, perché essi sono relativi a caratteristiche o pratiche umane inerenti; inoltre, esporre i soggetti a fattori di rischio dannosi è una pratica eticamente non accettabile⁷. Per di più, i dati osservazionali possono anche essere utili nel determinare l'efficacia di un intervento in una comunità, contrariamente alla messa a punto di un trial controllato⁸.

5.3.3 La collocazione temporale

Gli studi sono denominati **prospettici** quando il ricercatore osserva la popolazione, secondo l'ordine naturale degli eventi nel tempo (esposizione - eventuale comparsa di malattia). Mentre sono denominati **storici (retrospettivi)**, quando il ricercatore accerta l'esposizione o gli effetti sulla salute dopo la loro comparsa.

5.4 Studi descrittivi e le associazioni degli studi

Gli studi descrittivi esaminano la distribuzione della malattia e/o dei possibili determinanti ambientali di malatti, in una popolazione definita. Questi studi, non valutano formalmente l'associazione tra esposizione ed effetto sulla salute, benché possano essere di aiuto nel considerare la possibilità di un'associazione. Pertanto, i dati descrittivi sono comunemente usati per esaminare gli andamenti degli effetti sulla salute, secondo il luogo, il tempo e le persone.

Le associazioni causali possono essere dimostrate più chiaramente se è possibile un confronto fra gruppi che sono stati esposti a diversi livelli dell'agente ambientale.

La frequenza della malatti, è espressa come **prevalenza**, quando si basa sul numero di casi di malattia esistenti in un certo momento, o come **incidenza**, quando è basata sul numero di nuovi casi che insorgono in un dato periodo⁹.

5.5 La meta-analisi negli studi osservazionali

I principi dei metodi basati sull'evidenza, per determinare l'efficacia degli

⁷ Lipsett M, Campleman S. *Occupational exposure to diesel exhaust and lung cancer: a meta-analysis*. Am J Public Health, 1999, 89(7), p. 1009-1017.

⁸ Mann CC. *Can meta-analysis make policy?* Science, 1994; 266(5187), p. 960-962.

⁹ Greenland S. *Interpretation and choice of effect measures in epidemiologic analyses*. American journal of epidemiology. 1987; 125(5), p. 761-768.

interventi sanitari e le politiche di sanità pubblica, si stanno diffondendo in modo sempre più crescente¹⁰.

Nonostante la constatazione che la meta-analisi degli studi controllati randomizzati o *trial* “RCT” (*randomised controlled trial*) è più frequente di quelle usate negli studi osservazionali, si può constatare un notevole aumento nelle ultime decadi di questi ultimi¹¹.

5.5.1 Definizione di meta-analisi

La *meta-analisi* è un approccio sistematico, introdotto nelle scienze sociali da Glass¹² per identificare, apprezzare, sintetizzare e, se possibile, combinare i risultati dei singoli studi rilevanti, in modo da poter arrivare a conclusioni relative al corpo delle ricerche. E’ stata applicata in modo sempre crescente a *trial* clinici randomizzati considerati come gli studi migliori per fornire le evidenze più forti riguardanti un intervento¹³.

Quando le meta-analisi sono condotte in modo appropriato, possono assegnare un peso diverso a studi individuali, così che questi, con maggior precisione o più elevata qualità, daranno un contributo maggiore alla stima riassunta^{14,15,16}.

La maggiore preoccupazione relativa a questi studi riguarda la necessità di collezionare tutti gli studi, sia quelli pubblicati che quelli non pubblicati^{17,18,19}.

Tuttavia, in molte situazioni, i disegni di studio randomizzati controllati non sono fattibili e sono disponibili solo dati provenienti da studi osservazionali.

¹⁰ Bero LA, Jadad AR. *How consumers and policymakers can use systematic reviews for decision making*. Ann Intern Med., 1997; 127(1), p. 37-42.

¹¹ Stroup DF, et al. *Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group*. JAMA, 2000; 283(15), p. 2008-2012.

¹² Glass GV. *Primary, secondary, and meta-analysis of reasearch*. Educational researcher. 1976; p. 3-8

¹³ Thacker SB. *Meta-analysis. A quantitative approach to research integration*. JAMA, 1988; 259(11), p. 1685-1689.

¹⁴ Jones DR. *Meta-analysis of observational epidemiological studies: a review*. J R Soc Med., 1992; 85(3), p. 165-168.

¹⁵ Thompson SG, Pocock SJ. *Can meta-analyses be trusted?*. Lancet, 1991; 338(8775), p. 1127-1130.

¹⁶ Mengersen KL, et al. *The impact of method choice on meta-analysis*. Aust J Stat., 1995; 37(1), p. 19-44.

¹⁷ Rosenthal R. *The “file drawer problem” and tolerance for null results*. Psychol Bull., 1979; 86(3), p. 638-641.

¹⁸ Begg CB, Berlin JA. *Publication bias: a problem in interpreting medical data*. J R Stat Soc., 1988; 151(3), p. 419-463.

¹⁹ Berlin JA. *Does blinding of readers affect the results of meta-analyses? University of Pennsylvania Meta-analysis Blinding Study Group*. Lancet, 1997; 350(9072), p. 185-186.

5.5.2 Riassumere la letteratura attraverso le meta-analisi

Come già accennato, la *meta-analisi* è l'analisi quantitativa dei risultati combinati di molti studi ed ha lo scopo di fornire una misura riassuntiva delle conoscenze scientifiche, su uno specifico argomento²⁰. Per quanto riguarda l'epidemiologia ambientale, la meta-analisi possiede due fondamentali vantaggi, rispetto alle revisioni di letteratura non quantitative. Prima di tutto, fornisce un'unica stima che è la media dei risultati dei singoli studi, e questo elimina la confusione creata dal dover interpretare molteplici studi che presentano risultati differenti in termini di grandezza ed addirittura direzione, della stima di effetto osservata.

In secondo luogo, la meta-analisi possiede maggiore potenza statistica, in quanto i singoli studi inclusi sono combinati a costituire una popolazione unica.

Lo studio meta-analitico ha le sue radici nella ricerca clinica randomizzata e controllata, nella quale per determinare l'efficacia di un farmaco o di una tecnologia sono utilizzate metodologie di sperimentazione molto simili o standardizzate.

Le meta-analisi di studi epidemiologici osservazionali (studi caso-controllo) sono più problematiche rispetto agli studi sperimentali (clinical trials), poiché gli studi osservazionali non adottano approcci uniformi, come ad esempio nella raccolta dei dati, nei criteri di selezione dei soggetti e nella definizione dei casi e dei controlli ecc. Nonostante ciò, tecniche meta-analitiche sono spesso utilizzate per riassumere e pesare i risultati degli studi osservazionali riguardanti specifici problemi di salute legati all'ambiente.

L'approccio quantitativo meta-analitico dovrebbe condurre ad una integrazione dei risultati più obiettiva di quella effettuata con la "revisione" da parte di un solo esperto: in tal modo, infatti, si rimuove il rischio di interpretazione soggettiva. La meta-analisi può anche servire come primo passo logico, quando si proponga un nuovo progetto di ricerca, specialmente nel caso in cui si richieda un finanziamento esterno.

Fornire una misura pesata delle conoscenze esistenti può essere, infatti, necessario per ottenere il consenso per la pianificazione di un nuovo studio. L'esito sanitario identificato dalla meta-analisi può inoltre aiutare ad individuare specifici

²⁰ Dickersin K, Berlin JA. *Meta-analysis: state-of-the-science*. Epidemiol Rev., 1992; 14, p. 154-176.

argomenti o problemi che necessitino di ulteriore approfondimento e chiarificazione.

Tuttavia, le meta-analisi possiedono anche delle limitazioni. Per questo motivo, alcuni epidemiologi considerano con scetticismo il vasto consenso e la diffusa promozione degli studi meta-analitici^{21,22}. Uno dei problemi maggiori è che, nel tentativo di raggiungere una stima centrale di rischio, la meta-analisi trascura i vantaggi e gli svantaggi metodologici dei singoli studi. Unire semplicemente i risultati di studi inconclusivi, in una singola analisi per produrre una stima media, può non determinare un progresso nella comprensione di un problema di salute legato all'ambiente, anche se i limiti di confidenza possono diventare molto stretti (e quindi statisticamente significativi).

Inoltre, la sensazione che gli editori delle riviste scientifiche siano più disponibili ad accettare per la pubblicazione studi significativi, piuttosto che studi non significativi, anche quando questi ultimi siano di comparabile qualità, crea ulteriori problemi^{23,24}. Se tale sensazione corrisponde alla verità, e chi effettua la meta-analisi include in essa solo articoli già pubblicati, si produrrà un bias di pubblicazione verso le conclusioni positive. Alcuni ricercatori hanno tentato di provare che il bias di pubblicazione effettivamente esiste^{25,26}; tuttavia in pratica, la sua esistenza resta ancora dipendente dalla specifica rivista, dal periodo in studio, e dall'argomento studiato.

Tra i metodi proposti per la valutazione, vi è l'aggiustamento dei bias di pubblicazione nelle meta-analisi, che potrebbe rappresentare soltanto una

²¹ Goldman L, Feinstein AR. *Anticoagulants and myocardial infarction. The problems of pooling, drowning and floating.* Ann Intern Med., 1979; 90(1), p. 92-94.

²² Feinstein AR. *Para-analysis, faute de mieux, and the perils of riding on a data barge.* J Clin Epidemiol., 1989; 42(10), p. 929-935.

²³ Chalmers TC, et al. *Minimizing the three stages of publication bias.* JAMA, 1990; 263(10), p. 1392-1395.

²⁴ Dickersin K. *The existence of publication bias and risk factors for its occurrence.* JAMA, 1990; 263(10), p. 1385-1389.

²⁵ Easterbrook PJ, et al. *Publication bias in clinical research.* Lancet, 1991; 337(8746), p. 867-872.

²⁶ Dickersin K, et al. *Factors influencing publication of research results: follow-up of applications submitted to two institutional review boards.* JAMA, 1992; 267(3), p. 374-378.

soluzione improvvisata per correggere quello che potrebbe, invece, essere un serio ed incorreggibile bias^{27,28}.

Anche se le meta-analisi negli studi osservazionali presentano particolari difficoltà a causa di bias inerenti a differenze nel disegno dello studio²⁹, essi possono fornire un strumento per aiutare a capire e quantificare le fonti di variabilità nei risultati fra gli studi³⁰.

In pratica, si valuta se gli studi utilizzati (per aumentare le dimensioni del campione) differiscono l'un l'altro in maniera significativa e, per tale motivo, non è opportuno combinarli l'un con l'altro (pooling). Tale incompatibilità nei risultati quantitativi caratterizza appunto l'eterogeneità statistica.

Nel caso sia evidente la presenza di eterogeneità, è conveniente indagare sulle possibili cause della stessa. L'eterogeneità tra studi può derivare da differenze metodologiche, od anche da altre caratteristiche non conosciute degli studi.

Ad Atlanta nel 1997, si tenne un workshop per studiare i problemi relativi alla meta-analisi negli studi osservazionali, ed in questo congresso fu elaborato dai partecipanti (MOOSE group) un "consensus report" con una check-list³¹, cioè i criteri per la valutazione della qualità delle raccolte sistematiche.

Sono state sviluppate diverse check-list per la valutazione della qualità delle revisioni sistematiche, e tutte evidenziano alcuni punti critici:

- ✓ l'esplicitazione dei criteri di inclusione degli studi;
- ✓ dove (cioè interrogando in modo approfondito le banche dati di letteratura scientifica, ad esempio: Medline, MBASE, PsychLIT, CINAHL, Cochrane Library) e con quale strategia sono stati ricercati gli studi da includere, se sia specificato che non sono stati applicati limiti temporali o linguistici alla ricerca;

²⁷ Rosenthal R. *The "file drawer problem" and tolerance for null results*. Psychol Bull., 1979; 86(3), p. 638-641.

²⁸ Hetherington J, et al. *Retrospective and prospective identification of unpublished controlled trials: lessons from a survey of obstetricians and pediatricians*. Pediatrics, 1989; 84(2), p. 374-380.

²⁹ Huston P. *Cochrane Collaboration helping unravel tangled web woven by international research*. CMAJ, 1996; 154(9), p. 1389-1392.

³⁰ Steinberg KK, et al. *Comparison of effect estimates from a meta-analysis of summary data from published studies and from a meta-analysis using individual patient data for ovarian cancer studies*. Am J Epidemiol., 1997; 145(10), p. 917-925.

³¹ Stroup DF, et al. *Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group*. JAMA, 2000; 283(15), p. 2008-2012.

- ✓ come è stata valutata l'esistenza di studi in corso e/o non pubblicati;
- ✓ come è stata effettuata l'estrazione dei dati dagli studi. L'adozione di una scheda predefinita ed il lavoro svolto da almeno due revisori indipendenti;
- ✓ procedure di valutazione della qualità degli studi e come questa valutazione è stata considerata in sede di analisi. Se, per esempio, è stato effettuato uno studio di sensibilità, per verificare quanto uno studio di qualità metodologica incerta contribuisce alla direzione di un risultato, e se sono state formulate ipotesi al riguardo, o se studi di simile qualità metodologica sono stati comparati fra loro in sottogruppi;
- ✓ in che modo gli autori della revisione interpretano e discutono i loro risultati. In particolare è importante che i risultati derivino dai dati presentati, e non si confondano le considerazioni degli autori con i risultati delle analisi. È necessario, per esempio, che la carenza di studi non sia interpretata come l'esistenza di studi negativi³².

5.5.3 Metodi meta-analitici

Esistono molteplici metodi statistici utilizzabili per produrre misure meta-analitiche di sintesi degli studi epidemiologici.

a) Identificare tutti gli studi rilevanti per il quesito in esame

Una ricerca su MEDLINE, usando parole-chiave, è generalmente effettuata per identificare gli studi pubblicati riguardanti un determinato argomento. Generalmente, viene usata anche la bibliografia citata all'interno degli articoli identificati e recuperati.

Se si decide di includere nell'analisi studi non pubblicati, anche questi devono essere identificati e recuperati. Gli abstracts dei congressi e le raccomandazioni concernenti gli studi in corso possono essere esaminati, e i contatti personali con i ricercatori attivi in un determinato ambito sono in questo caso preziosi. Gli studi non pubblicati e che non abbiano subito un processo di revisione tra pari costituiscono un importante dilemma per quanto riguarda la valutazione dei loro meriti scientifici.

³² Ferri M. *Le revisioni sistematiche*. Care, 2004; 2, p. 23-25.

b) Risolvere i problemi relativi alla qualità degli studi e alle eventuali inconsistenze nei risultati

Poiché le differenze tra gli studi, per quanto riguarda la popolazione in studio e la metodologia utilizzata, possono determinare inconsistenze nei risultati, queste caratteristiche/attributi dovrebbero essere attentamente valutate, per decidere quanto effettivamente pesino sulle inconsistenze stesse. Ogni studio la cui conduzione sia ritenuta non soddisfacente dovrebbe essere escluso da un'eventuale meta-analisi.

I criteri utilizzati per giudicare uno studio soddisfacente oppure no devono essere adeguatamente descritti. È generalmente utile a questo proposito stabilire degli standard minimi di qualità prima di cominciare la meta-analisi.

Se gli studi con risultati divergenti sono di qualità soddisfacente, la misura di sintesi meta-analitica tenderà ad assumere una posizione “centrale” tra gli studi che divergono, ma quelli più grandi avranno un peso maggiore. Studi molto eterogenei tra di loro non dovrebbero infatti essere combinati, e per valutare quantitativamente l'eterogeneità sono stati proposti diversi metodi statistici^{33,34}.

c) Stabilire il peso dei singoli studi e calcolare stime di rischio pesate

Generalmente, il peso assegnato ad uno studio è determinato dalla grandezza dello studio stesso. È un processo analogo all'analisi di Mantel-Haenszel: il peso è proporzionale all'inverso della varianza stimata di ogni studio³⁵.

Sono disponibili tre metodi per calcolare la stima combinata di effetto: il metodo di Mantel-Haenszel, il metodo di Peto, il metodo basato sulla varianza generale. I primi due richiedono che i dati degli articoli pubblicati siano disponibili in tavole di contingenza (per esempio, tavole 2x2). Un vantaggio del terzo metodo, è il fatto che richiede soltanto la stima di effetto e i relativi limiti di confidenza³⁶.

³³ Simon R. *Overviews of randomized clinical trials*. Cancer Treat Rep., 1987; 71(1), p. 3-5.

³⁴ Naylor CD. *Two cheers for meta-analysis: problems and opportunities in aggregating results of clinical trials*. CMAJ, 1988; 138(10), p. 891-895.

³⁵ Greenland S, Salvan A. *Bias in the one-step method for pooling study results*. Stat Med., 1990; 9(3), p. 247-252.

³⁶ Petitti D. *Meta-analysis and endocrinology*. Endocrinol Metab Clin North Am., 1997; 26(1), p. 31-44.

5.5.4 La meta-analisi come strumento per l'elaborazione di politiche di igiene ambientale

Nonostante le sopracitate limitazioni, la meta-analisi è probabilmente destinata a rimanere una tecnica popolare per:

- a) riassumere i risultati degli studi di epidemiologia ambientale;
- b) combinare studi individuali che possiedano bassa potenza statistica;
- c) aiutare i ricercatori a raggiungere il consenso, quando i risultati degli studi siano divergenti o in conflitto gli uni con gli altri.

Può essere anche un utile strumento per comunicare a chi elabora politiche, a chi decide l'allocazione dei finanziamenti e ad altri che determinati rischi ambientali sono reali e richiedono azioni preventive o correttive.

Fornendo una misura sintetica sullo stato delle conoscenze epidemiologiche riguardanti uno specifico problema, la meta-analisi può aiutare ad evitare il proliferare di nuovi e costosi progetti di ricerca, laddove non siano necessari.

5.6 Questionari

I questionari sono una fonte importante di informazioni nello studio dell'esposizione. Essi hanno principalmente il compito di fornire informazioni utili ad orientare le misure dell'esposizione, e a collegare gli individui alle misure ambientali, quando non è possibile eseguire campionamenti personali.

I soggetti possono anche riportare sul questionario i loro sintomi, e questi possono guidare i campionamenti ambientali. I questionari possono venire usati come fonte primaria di informazione sull'esposizione, qualora le misurazioni dirette, personali o ambientali, siano troppo costose o complesse. Infine, i questionari possono essere usati per avere informazioni circa i fattori modificanti l'effetto potenziale di una esposizione sulla salute. Le tipologie di lavoro e di attività, ad esempio, che possono essere riferite in un questionario, influenzano l'esposizione e la dose.

I questionari sono somministrati generalmente in un momento preciso, o ad intervalli di tempo abbastanza lunghi nel corso dello studio, e quindi possono insorgere problemi di memoria dei soggetti nel ricordare dettagliate informazioni.

I questionari sono i principali mezzi con cui gli epidemiologi raccolgono informazioni sulle caratteristiche della popolazione da studiare. Attraverso i

questionari si possono raccogliere informazioni demografiche (es. età, sesso, razza, gruppo etnico), sui fattori sociali (es. occupazione, educazione, stato socioeconomico), sulle abitudini personali (es. fumo, farmaci, uso di droghe), sulle caratteristiche genetiche (es. condizioni ereditarie), e infine sull'anamnesi individuale e familiare (es. ipertensione, diabete, malattie cardiache, tumori, effetti sulla riproduzione).

I questionari dovrebbero essere disegnati avendo in mente il concetto di brevità, poiché è sempre presente la tentazione di “fare una domanda in più”. Spesso il tasso di partecipazione è inversamente proporzionale alle dimensioni del questionario (cioè, più è ampio il questionario, minore è il tasso di risposta). I questionari dovrebbero essere disegnati per rispondere a domande molto specifiche, e, se possibile, dovrebbero essere preparati in maniera tale che chi risponde possa scegliere tra un limitato spettro di risposte predefinite.

Quando si costruisce un questionario, dovrebbero essere considerate la lingua e le caratteristiche culturali della popolazione in studio. Le domande dovrebbero essere espresse in un linguaggio semplice, non ambiguo e facilmente comprensibile da tutti i membri della popolazione. Si dovrebbero considerare le possibili reazioni di chi risponde alle domande nel questionario, dato che la posizione di alcune domande può indurre a rifiutare le successive.

5.7 Confondimento

Scopo fondamentale dell'analisi dei dati è quello di identificare e controllare i fattori estranei all'associazione tra esposizione ed esito sulla salute, in grado di distorcerla.

Il confondimento si verifica se i gruppi esposti e non esposti non sono paragonabili a causa della differenza nel background del rischio^{37,38}. Le differenze sono solitamente dovute a caratteristiche individuali, come l'età, il sesso, il background socioeconomico o l'esposizione ad altri fattori di rischio.

Il *confondimento* si può controllare stratificando i dati in sottogruppi, in relazione ai livelli del/i fattore/i di confondimento, e calcolando uno stimatore di effetto

³⁷ Greenland S, Robins JM. *Confounding and misclassification*. Am J Epidemiol., 1985; 122(3), p. 495-506.

³⁸ Greenland S, Robins JM. *Identifiability, exchangeability, and epidemiological confounding*. Int J Epidemiol., 1986; 15(3), p. 413-419.

globale, aggregando le informazioni ottenute dagli strati. Solitamente, in una analisi stratificata non è possibile il controllo per più di due o tre fattori contemporaneamente, per problemi di bassa “numerosità” all’interno degli strati. I modelli di analisi multivariata sono preferibili proprio perché permettono il controllo simultaneo di un gran numero di fattori di confondimento. In generale, il controllo del confondimento richiede l’utilizzo attento di conoscenze *a priori*, insieme ad una valutazione della portata della variazione della stima dell’effetto, dovuta al controllo del fattore confondente in fase di analisi.

La stratificazione può anche essere usata per il parziale controllo degli effetti, dei bias di selezione e di informazione, se si possono identificare variabili surrogate che siano correlate con le fonti di bias. Anche quando non fosse praticabile un controllo di questo tipo in fase di analisi è generalmente raccomandabile l’utilizzo di strategie, come l’analisi delle misure ripetute, per stimare quantitativamente la *validità* e l’*affidabilità* delle osservazioni dello studio.

5.8 La distorsione (bias)

Per *distorsione* si intende qualunque fattore che porta ad avere a disposizione dati che danno un’idea sbagliata della realtà. Le principali distorsioni metodologiche sono quelle^{39,40}:

- da **selezione** (che porta ad avere campioni non rappresentativi o differenze nelle caratteristiche dei gruppi a confronto), derivante dalle procedure usate per selezionare soggetti all’interno della popolazione in studio. Il bias di selezione desta maggiori preoccupazioni negli studi caso-controllo, dato che in tali studi interviene il campionamento. In particolare, vi può essere bias di selezione in uno studio caso-controllo se i controlli sono scelti in modo non rappresentativo: ad esempio, nel caso in cui ci fosse una maggiore propensione a selezionare come controlli gli individui esposti rispetto ai non-esposti, come può avvenire se i controlli per i casi di una malattia sono soggetti ricoverati con altre malattie (non utilizzare i D.P.I., aumenta il rischio di Parkinson e di molte altre affezioni).

³⁹ Rothman KJ, Greenland S. *Modern epidemiology. 2nd edition*. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott-Raven. 1998.

⁴⁰ Beaglehole R, et al. *Basic epidemiology*. Geneva: World Health Organization. 1993.

- da **rilevazione** (differenze nelle modalità di rilevazione nei gruppi a confronto);
- di **informazione**, derivante da un'errata classificazione dei soggetti in studio, relativamente alla malattia o all'esposizione. Esso è anche comunemente definito **bias di osservazione**, **bias di misurazione**, o **bias di errata classificazione**, dal momento che gli errori di informazione, solitamente risultano durante la misurazione o la classificazione delle variabili dello studio. Tale bias di informazione si riferisce ai soggetti inclusi nel campione, mentre il bias di selezione si riferisce alla selezione dei soggetti in studio, derivanti dalla base dello studio.
- da **conduzione**;
- da **perdita al follow-up** (che può portare ad un tipo di distorsione da selezione nelle rilevazioni finali) o da “insufficiente durata del follow-up”, per cui si osservano solo risultati a breve termine, che potrebbero non essere confermati in seguito;
- da **fluttuazione casuale**;
- da **pubblicazione**. Questa è un'altra distorsione che si cerca di stimare nelle meta-analisi (*publication bias*); infatti, gli studi negativi, soprattutto se di piccole dimensioni, tendono ad essere meno pubblicati. Di conseguenza, è l'errore sistematico introdotto in una meta-analisi dallo stato della letteratura, qualora vi sia una maggiore propensione ad accettare per la pubblicazione studi con risultati positivi (relazioni significative o risultati favorevoli ad una terapia) rispetto a quelli negativi.

Per stimare l'entità del *publication bias*, si può ricorrere al metodo dell'imbutto rovesciato, basato sul fatto che le misure dell'effetto dovrebbero essere distribuite casualmente attorno all'effetto medio, con meno variazioni negli studi più numerosi che in quelli di piccole dimensioni. Se si riportano in un diagramma cartesiano la misura dell'effetto sull'ascissa e la dimensione dello studio sull'ordinata, i vari punti, ciascuno corrispondente a uno studio, dovrebbero disegnare una specie di imbutto rovesciato. La distorsione da pubblicazione fa sì che siano più o meno rari i punti da un lato in basso, cioè

quelli corrispondenti agli studi più piccoli e con risultati più sfavorevoli per il trattamento di interesse.

Il *publication bias* non è il solo bias che si può introdurre in una meta-analisi. Possiamo infatti verificare la possibilità di “Location bias”, “Language bias”, “Citation bias”, “Multiple Publication bias”, “Database bias”, “Inclusion bias”⁴¹.

5.9 Validità degli studi

Il fine di ogni studio di epidemiologia ambientale, è quello di ottenere una stima la più accurata possibile dell’associazione quantitativa fra fattore ambientale ed occorrenza della malattia. La strategia di base per valorizzare la qualità di uno studio epidemiologico consiste nel disegnarlo in modo da minimizzare l’errore potenziale.

La *validità* (o accuratezza) è il limite del controllo sugli errori sistematici. L’errore è generalmente classificato come casuale o sistematico^{42,43}. L’*errore sistematico* avvicina o allontana in modo sistematico la stima dell’effetto osservato rispetto al valore reale, mentre l’*errore casuale* è la divergenza dovuta al caso, del valore osservato su un campione rispetto al valore reale della popolazione. L’errore casuale è dovuto alla variabilità dei dati che si ha lavorando con piccoli numeri, ma può essere ridotto facendo uno studio più allargato. L’errore sistematico è un aspetto intrinseco al disegno dello studio e alla popolazione indagata, e non può essere ridotto semplicemente conducendo uno studio allargato.

5.10 Cochrane Collaboration

Le rassegne sistematiche hanno assunto una certa rilevanza da quando, nel 1993, venne istituita la Cochrane Collaboration, un’organizzazione internazionale costituita con il principale scopo di produrre rassegne sistematiche per tutti i campi della sanità, di mantenerle regolarmente aggiornate e di renderle disponibili (a questo scopo è stata creata la banca dati nota come Cochrane Library), e le

⁴¹ Egger M, et al. *Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test*. BMJ, 1997; 315(7109), p. 629–634.

⁴² Rothman KJ, Greenland S. *Modern epidemiology. 2nd edition*. Philadelphia, Pennsylvania: Lippincott-Raven. 1998.

⁴³ Beaglehole R, et al. *Basic epidemiology*. Geneva: World Health Organization. 1993.

stesse rassegne possono, se efficacemente condotte, portare a risultati notevoli. È stata fondata nel 1993 ad Oxford, sul nascere del movimento EBM (Evidence Based Medicine).

La principale caratteristica è data dalla presenza di una sezione di metodi, che descrive la strategia di reperimento degli articoli originari e i criteri di selezione degli stessi, ovverossia di un protocollo ben definito.

La Cochrane Library comprende diversi database⁴⁴:

- Il *Cochrane Database of Systematic Reviews*, che contiene protocolli e revisioni sistematiche sull'efficacia degli interventi sanitari, preparate e aggiornate dai Gruppi Collaborativi di Revisione;
- Il *Database of Abstracts of Reviews of Effects*, organizzato e aggiornato dal Centre for Reviews and Dissemination di York (UK), contiene valutazioni critiche e abstract strutturati di altre revisioni sistematiche, che rispettano precisi criteri di qualità;
- Il *Cochrane Central Register of Controlled Trials (central)*, che contiene le referenze bibliografiche di oltre 350mila studi clinici controllati condotti a livello internazionale;
- Il *Cochrane Database of Methodology Reviews*, che contiene i protocolli di studi sulla metodologia delle revisioni sistematiche preparati dal Methodology review Group;
- Il *Cochrane Methodology Register*, che contiene le referenze bibliografiche di articoli e libri sulla metodologia delle revisioni sistematiche. La Cochrane Library contiene anche un manuale di riferimento sulle modalità con cui, in ambito Cochrane, devono essere condotte le revisioni sistematiche;
- La *sezione della Cochrane Collaboration* nella *Cochrane Library* che contiene informazioni sui Gruppi Collaborativi di Revisione e le altre entità nell'ambito della Cochrane Collaboration.

⁴⁴ The Cochrane Collaboration. *The Cochrane database of systematic reviews*. Vol. 2. 1999.

5.11 I metodi di correlazione “Mantel-Haenszel”

Le tabelle sono di solito il risultato di uno stesso studio, in cui i dati sono stati stratificati, cioè disaggregati sulla scorta di una determinata variabile che si ritiene possa influenzare il risultato. È pertanto utile combinare le informazioni tra le tabelle per giungere ad un'unica conclusione complessiva^{45,46}.

Il metodo di Mantel-Haenszel è la tecnica statistica più appropriata per combinare le informazioni di due o più tabelle di contingenza, fornendo una stima della forza dell'associazione tra esposizione ed effetto che è dato dalla media ponderata degli odds ratio delle singole tabelle.

Permette inoltre di valutare l'influenza della presenza di un fattore confondente sulla grandezza o sulla direzione della relazione tra esposizione e effetto, evitando che la grandezza dell'associazione appaia maggiore di quanto sia in realtà.

Prima di combinare le tabelle di contingenza, occorre verificare che gli odds ratio della popolazione siano veramente uguali tra le tabelle, cioè se la forza di associazione è uniforme tra le tabelle; altrimenti non è appropriato calcolare un singolo valore per l'odds ratio globale, ed è preferibile trattare i dati delle diverse tabelle di contingenza, come se fossero stati estratti da popolazioni diverse, riportando gli odds ratio di ciascun gruppo^{47,48}.

Se è appropriato combinare i risultati delle tabelle, il metodo di Mantel-Haenszel fornisce gli strumenti necessari per calcolare una stima puntuale, e un intervallo di confidenza per l'odds ratio globale della popolazione; inoltre, consente di verificare l'ipotesi nulla di assenza di associazione tra esposizione e malattia^{49,50}.

Si sottolinea l'utilità del metodo di Mantel-Haenszel in quanto consente di esaminare due o più tabelle di contingenza, provenienti da studi diversi, eliminando l'effetto di fattori confondenti, tra esposizione ed effetto, e

⁴⁵ Mantel N, Haenszel W. *Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease*. J Natl Cancer Inst., 1959; 22(4), p. 719-748.

⁴⁶ Pagano M, Gauvreau K. *Principles of biostatistics*. Belmont, California: Wadsworth, Inc. 1993.

⁴⁷ Schlesselman JJ. *Case-control Studies. Design, conduct and analysis*. Oxford university press, Oxford. 1982.

⁴⁸ Wasserteil-Smoller S. *Biostatistics and epidemiology*. Springer-Verlag, New York. 1990.

⁴⁹ Mantel N. *Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration*. Cancer Chemother Rep., 1966; 50(3), p. 163-170.

⁵⁰ Rothman KJ, Greenland S. *Modern epidemiology. 2nd edition*. Philadelphia, Pennsylvania. Lippincott-Raven. 1998.

successivamente stimando l'eventuale significatività statistica della variabile in studio^{51,52}.

⁵¹ Schlesselman JJ. *Case-control Studies. Design, conduct and analysis*. Oxford university press, Oxford. 1982.

⁵² Wasserteil-Smoller S. *Biostatistics and epidemiology*. Springer-Verlag, New York. 1990.

CAPITOLO 6

MATERIALI E METODI

6.1 Le revisioni sistematiche

Le revisioni sistematiche (RS) rappresentano un utile strumento per l'attività di ricerca sulla Prevenzione basata sull'evidenza (EBP), al fine di promuovere interventi di prevenzione di comprovata efficacia che possono aiutare a superare alcuni ostacoli, utilizzando nel migliore dei modi i dati noti, su un determinato problema di sanità pubblica, e sulle sue potenziali soluzioni.

Pertanto, le RS sono veri e propri progetti di ricerca, che sintetizzano e valutano criticamente in un unico documento, gli esiti di tutti gli studi sperimentali condotti riguardo ad un determinato e ben definito quesito clinico o intervento sanitario.

Inoltre, il ricorso ad un approccio basato su evidenze per individuare e raccomandare interventi efficaci, finalizzati a raggiungere specifici obiettivi di sanità pubblica, può tuttavia consentire di limitare gli errori nelle modalità di raccolta e interpretazione dei dati, di mettere in luce lacune importanti nello stato attuale delle conoscenze, indirizzando così le ricerche successive.

Le revisioni sistematiche di studi epidemiologici¹, si basano su:

- I) Revisioni narrative;
- II) Analisi statistiche eseguite sui risultati di studi pubblicati in letteratura (tradizionalmente classificate come meta-analisi);
- III) Stime globali, ottenute a partire dai dati individuali, rianalizzati in una fase successiva;
- IV) Combinazione dei risultati degli studi individuali, parte integrante del protocollo dello studio.

Le meta-analisi di tipo IV offrono le migliori garanzie di comparabilità tra studi, e si avvicinano come qualità alle meta-analisi di studi clinici controllati, anche se richiedono maggiori sforzi organizzativi. Infatti, partendo da questo tipo di studio, si è ritenuto effettuare una combinazione degli studi caso-controllo disponibili e

¹ Blettner M, et al. *Traditional reviews, meta-analyses and pooled analyses in epidemiology*. Int J Epidemiol., 1999; 28(1), p. 1-9.

che trattavano l'argomento dell'esposizione al "paraquat" e possibile sviluppo del morbo di Parkinson.

Altro elemento importante degli studi osservazionali è il controllo del confondimento in fase di analisi statistica, attraverso appropriati accorgimenti di disegno dello studio.

Tuttavia la variabilità tra studi può offrire importanti ipotesi di ricerca e costituire un obiettivo importante di un programma di meta-analisi.

Il gruppo MOOSE (Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology)², ha fornito un Consensus Statement che riguarda però soltanto le meta-analisi di studi pubblicati, dove più rilevanti appaiono i problemi di confrontabilità e generalizzabilità dei risultati, ove bisogna garantire che:

- a) siano stati considerati gli stessi fattori di confondimento;
- b) i criteri di inclusione siano omogenei;
- c) il disegno dello studio e le metodologie di analisi siano omogenei;
- d) il controllo della distorsione da pubblicazione selettiva dei piccoli studi, con risultati positivi.

In conclusione, le revisioni sistematiche presentano alcune criticità di interpretazione e/o problemi di aggregazione dei dati, quali:

- Meta-analisi diverse sullo stesso argomento, possono dare risultati diversi;
- Il principale risultato è la stima quantitativa dell'effetto medio e del range di effetti ottenuti dal trattamento in tutti gli studi;
- Il valore di una meta-analisi dipende dalla qualità degli studi che la compongono.

6.2 Misura del rischio: odds ratio (OR) e rischio relativo (RR)

Confrontare la frequenza della malattia negli esposti con la frequenza della malattia nei non esposti si basa attraverso una valutazione dell'esistenza di una associazione attraverso due variabili: la presunta causa (o *variabile indipendente*) e l'effetto (o *variabile dipendente*, subordinato alla variabile indipendente). In genere, l'effetto è rappresentato dalla comparsa della malattia, e quindi l'esistenza dell'associazione si dimostra confrontando la frequenza della malattia in due

² Stroup DF, et al. *Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group*. JAMA, 2000; 283(15), p. 2008-2012.

popolazioni costituite rispettivamente da esposti e non esposti ad una presunta causa (o *determinante*, o *fattore di rischio*).

L'esistenza di una associazione può essere accertata attraverso studi prospettivi o retrospettivi. Se lo studio è retrospettivo, si calcola l'odds ratio (OR), se lo studio è prospettivo, si calcola il rischio relativo (RR).

In uno studio retrospettivo si inizia selezionando i casi e i controlli, e poi andando ad accertare quanti fra i casi (e quanti fra i controlli) sono stati esposti alla presunta causa. Esposizione = variabile indipendente, malattia = variabile dipendente.

Il metodo da utilizzare per la misurazione dell'associazione in uno studio retrospettivo è il calcolo del cosiddetto “**odds ratio**” (OR) o *rapporto incrociato*.

Gli odds, sono rappresentati dal rapporto fra il numero di volte in cui l'evento si verifica (o si è verificato) ed il numero di volte in cui l'evento non si verifica (o non si è verificato).

L'“odds ratio” si calcola attraverso i semplici rapporti (odds) fra le frequenze osservate e non attraverso le *proporzioni*.

$$OR = \frac{a / c}{b / d} = \frac{a}{b} \times \frac{d}{c} = \frac{ad}{bc}$$

Se il test risulta non significativo, è possibile calcolare l'OR globale:

$$OR = \frac{\frac{\sum_{i=1}^k a_i d_i}{n_i}}{\frac{\sum_{i=1}^k b_i c_i}{n_i}}$$

Diversamente da uno studio retrospettivo, uno studio prospettivo inizia suddividendo la popolazione in esposti e non esposti, e poi osservando nel tempo quanti fra gli esposti (e quanti fra i non-esposti) si ammalano.

Il “**rischio relativo**” (RR, in inglese *risk ratio*) è il rapporto fra il rischio nel gruppo degli esposti e il rischio nel gruppo dei non esposti. Per definizione: il rischio relativo, è il rapporto tra l'incidenza negli esposti e l'incidenza nei non esposti (dove *incidenza* significa proporzione di nuovi casi).

$$RR = \frac{a / (a + b)}{c / (c + d)}$$

6.2.1 Interpretazione dell'odds ratio e del rischio relativo

L'interpretazione è identica, sia che si tratti di OR che di RR. Infatti, un valore =1, indica assenza di associazione tra malattia ed esposizione, mentre un valore <1, indica una associazione negativa (cioè il fattore può *proteggere* dalla malattia), mentre un rapporto >1 indica l'esistenza di una associazione positiva (il fattore può *causare* la malattia). Naturalmente, valori crescenti indicano associazioni più forti.

Prima di dichiarare l'esistenza di un rapporto causa-effetto tra l'esposizione e la malattia, deve essere eseguito un test di significatività statistica (per escludere che la differenza sia dovuta al caso), e poi devono essere verificati i *criteri di causalità*.

A rigore, l'odds ratio non è una autentica misura del rischio, in quanto si riferisce alla probabilità di *avere già* una malattia, mentre nel termine "rischio" è implicita l'idea di un evento che *si verificherà in futuro*. Tuttavia, se si suppone che la durata media della malattia negli esposti sia simile a quella nei non-esposti (e che la malattia non influenzi lo stato di esposizione), allora l'odds ratio rappresenta una buona misura del rischio relativo³.

6.3 Errore standard e limiti fiduciali

L'**errore standard** rappresenta un parametro fondamentale che viene comunemente impiegato per il calcolo dei **limiti fiduciali** (inferiore e superiore), l'**intervallo di confidenza**. I limiti fiduciali sono molto utili per avere un'idea della vera caratteristica della popolazione che stimiamo tramite un campione.

Gli intervalli di confidenza (in inglese "*confidence interval*") rappresentano il *range* entro cui è possibile che si collochi il vero "*effect size*". L'intervallo di confidenza esprime il livello di precisione associato alla stima di un parametro: tanto più è piccolo, tanto più indica che la stima è precisa. Il limite fiduciale può essere fissato al livello di probabilità desiderato; comunemente si utilizza un limite fiduciale pari a 0,95 o 0,99 che, espressi in termini di probabilità percentuale, corrispondono a "limite fiduciale 95%" o "limite fiduciale 99%".

³ Lopalco PL, Tozzi AE. Epidemiologia facile, Il Pensiero Scientifico. 2007.

Le espressioni “intervallo di confidenza 95%” o “limite fiduciale 95%” implicano che vi è una probabilità del 95% che l’intervallo trovato includa la vera caratteristica della popolazione.

Per campioni ragionevolmente ampi (almeno 50-60 osservazioni), i limiti fiduciali 95% possono essere espressi come valore statistico ± 2 volte l’errore standard.

$$p \pm 1.96 = \sqrt{\frac{p(1-p)}{N}}$$

6.4 La meta-analisi

Come già accennato, la meta-analisi è una tecnica statistica che permette di combinare e sintetizzare in un’analisi combinata di informazioni quantitative, ottenute dai dati raccolti di due o più studi indipendenti e selezionati (sulla base di definiti criteri) dall’insieme, possibilmente completo, di studi volti ad indagare uno specifico fenomeno di interesse, e col fine di ricavarne un unico dato conclusivo, anche attraverso la rappresentazione grafica di sintesi il “Forest plot”.

Uno dei primi esempi di questo tipo di analisi risale ai primi anni del novecento (1904), ed è dovuto agli studiosi Pearson⁴ e Fisher⁵.

Una procedura corretta deve indicare i seguenti elementi:

- obiettivo;
- partecipanti;
- interventi;
- outcome (variabile a cui si è interessati);
- criteri di inclusione e di esclusione;
- tipo di studi;
- ricerca bibliografica (manuale o computerizzata: MedLine, Cochrane, Embase).

I problemi fondamentali di una meta-analisi nascono molto prima di iniziare la vera e propria analisi statistica dei dati, e sostanzialmente a partire dalla ricerca bibliografica.

⁴ Pearson K. *On a method of determining whether a sample of size n supposed to have been drawn from a parent population having a known probability integral has probably been drawn at random.* Biometrika, 1933; 25, p. 379–410.

⁵ Fisher RA. *Statistical Methods for Research Workers*, 4th ed. Oliver and Boyd, Edinburgh. 1932.

Molto spesso, gli studi che producono risultati positivi e differenze significative hanno più probabilità di essere pubblicati di quelli che danno risultati nulli o non significativi. Questo è il fenomeno del “bias” di pubblicazione. Fenomeno dovuto, in parte alla perplessità degli autori a pubblicare conclusioni negative, e in parte al decrescente entusiasmo dei ricercatori che spesso abbandonano gli studi prima di concluderli e pubblicarli (qualora portino a risultati negativi).

Nella meta-analisi, il confronto tra i soli studi pubblicati potrebbe portare a conclusioni non corrette (troppo ottimistiche): le informazioni pubblicate su uno specifico esperimento possono risultare distorte in favore di un effetto positivo⁶.

Quindi gli obiettivi di una meta-analisi, sono:

- Aumentare la potenza statistica;
- Risolvere controversie quando gli studi mostrano risultati contrastanti;
- Migliorare le stime;
- Rispondere a quesiti non considerati nei singoli studi.

Mentre le fasi di una meta-analisi sono:

- Metodi di ricerca degli studi effettuati sul fenomeno di interesse;
- Utilizzo di data-base specifici;
- Criteri di ammissione degli studi;
- Variabili di risposta;
- Disegno dello studio;
- Risultati usati per la combinazione;
- Metodi statistici;
- Studio della eventuale eterogeneità.

Infine, i metodi per combinare i risultati sono:

- Effetti fissi: l’interesse è circoscritto agli studi che sono stati inclusi nella meta-analisi;
- Effetti variabili: gli studi analizzati costituiscono un campione estratto da una popolazione più ampia di possibili studi.

Il modello ad effetti fissi pesa ogni studio con l’inverso della varianza:

⁶ Greenland S. Quantitative methods in the review of epidemiologic literature. *Epidemiol Rev.*, 1987; 9, p. 1–30.

$$w_i = \frac{1}{se_i^2}$$

Invece, il modello ad effetti casuali pondera ogni studio con l'inverso della varianza campionaria più una costante che rappresenta una stima della variabilità tra gli effetti in popolazione:

$$w_i = \frac{1}{se_i^2 + \hat{w}_\theta}$$

Nella meta-analisi ad effetti fissi, la misura di interesse (es. OR, RR) è individuata mediante una stima ponderata dei risultati dei singoli studi.

Per esempio, il fattore di ponderazione di ciascuno studio è inversamente proporzionale alla varianza della misura di interesse.

6.5 Metodica di selezione e di inclusione degli studi

La strategia di ricerca ideale è quella che consente di reperire, su scala internazionale, tutti gli studi, pubblicati e non, che riguardano l'argomento della revisione. Infatti, una domanda ben posta aiuta nell'identificare gli studi eleggibili, ovvero quegli studi che dal titolo o dall'abstract sembrano poter fornire dei risultati utili.

Per garantire un'elevata completezza, le ricerche devono essere condotte considerando molte e diverse fonti: database elettronici (Medline, Embase, ... etc), registri nazionali ed internazionali, periodici non indicizzati, referenze bibliografiche degli studi inclusi ecc..

Dopo aver selezionato i singoli studi che formano il corpus delle prove di efficacia relative ad un intervento, si procede alla loro valutazione, all'estrazione dei risultati, alla sintesi del corpus generale di evidenze, e alla valutazione della forza delle prove di efficacia (ossia degli elementi che attestano che i cambiamenti degli esiti sono attribuibili agli interventi considerati).

Ciascuno studio, conforme ai criteri di inclusione utilizzati, deve presentare informazioni relative ai seguenti aspetti:

- intervento preso in esame;
- contesto nel quale è stato condotto lo studio (popolazione, setting);
- disegno;
- qualità dello studio;
- risultati.

L'adeguatezza del disegno sperimentale è verificata alla luce di numerose caratteristiche che contribuiscono a evitare una serie di potenziali limiti che possono inficiarne la validità⁷.

Se, infatti, gli studi su un determinato parametro risultano molto eterogenei, il criterio con cui si sceglie di trattare questa diversità può essere fondamentale, sia ai fini della valutazione di efficacia, sia alla sua applicabilità.

Decidere di escludere studi favorevoli all'intervento, ma non randomizzati, può cambiare la stima di effetto di un trattamento, così come decidere di considerare solo un certo tipo di soggetti (ad esempio solo i giovani) delimita il campo cui i risultati della revisione sono riferibili.

La diversità degli studi è sia metodologica (disegno di studio), sia di merito (tipo di soggetti esposti e/o malati di Parkinson). Oltre a questa esiste, poi, un'altro tipo di eterogeneità, quella statistica, che riguarda differenze significative nei risultati degli studi.

L'eterogeneità è la più importante e, se accentuata, rende impossibile il pooling dei risultati nella meta-analisi. L'*eterogeneità statistica* è rilevata attraverso un test, e evidenzia situazioni "conflittuali" tra gli studi inclusi nella meta-analisi in cui si ha un eccesso di differenza nei risultati.

L'eterogeneità statistica non spiega però l'origine di queste differenze, ma la decisione rispetto all'eterogeneità può essere presa sulla base dei seguenti aspetti⁸:

1. Valore del test statistico di eterogeneità (Chi-quadro);
2. Scostamenti tra le stime puntuali degli effetti dei diversi studi;
3. Sovrapposizione degli intervalli di confidenza.

Per i revisori è importante, quindi, saper distinguere sia il tipo di eterogeneità cui si trovano di fronte, sia operare delle scelte al suo interno.

L'effetto di queste scelte sui risultati finali può essere successivamente valutato tramite un'analisi di sensitività. Questa, infatti, verifica la consistenza dei risultati, al variare dei parametri di inclusione, e li descrive poi come robusti (non variabili) o sensibili (variabili), rispetto ad ogni parametro.

⁷ The Cochrane Collaboration. *The Cochrane database of systematic reviews*. Vol. 2. 1999.

⁸ Jefferson T, Zarrà L. *Bufale spotting, part two: assessing systematic reviews*. J R Soc Med., 2007; 100(4), p. 180-181.

A partire da questa attenta analisi, nel nostro studio sono stati utilizzati studi provenienti da:

- 1) banche dati come MEDLINE, CCINFO, CHEMINFO, CANCERNET, TOXLINE;
- 2) fonti citate negli articoli ottenuti come risultato dalla ricerca condotta nei diversi data-base;
- 3) ricerche bibliografiche dirette in biblioteca;
- 4) motori di ricerca usando come “parole chiave”: neurotossine ambientali, paraquat, Parkinson, neurodegenerazione, meta-analisi

Inoltre sono stati inclusi nell’analisi articoli che rispondevano ai seguenti criteri:

- studi in inglese e/o italiano, senza considerare studi pubblicati in altre lingue;
- studi che riportavano informazioni: sulla capacità di testare le ipotesi dello studio; sulla modalità di selezione e codifica dei dati; sui criteri di qualità; sui metodi statistici utilizzati, ecc..;
- studi che definivano inoltre: spiegazioni alternative per le osservazioni effettuate; permettevano la generalizzazione dei risultati; e davano indicazioni su ricerche future.

Mentre sono stati esclusi dall’analisi articoli che presentavano le seguenti caratteristiche:

- dati insufficienti per determinare una stima dell’ OR e del LC (limite/intervallo di confidenza);
- i gruppi studiati erano inseriti in studi più ampi con lo stesso disegno;
- la malattia studiata non era precisamente definita come Parkinson;
- notizie sull’esposizione erano di natura esclusivamente qualitativa (job-title).

Sulla base delle strategie di ricerca sopra indicati sono stati selezionati circa 11 studi con unico disegno (caso-controllo), da cui sono stati estratti gli estimatori di rischio (OR). Tutti gli studi selezionati trattavano esclusivamente informazioni legate all’esposizione all’erbicida *paraquat*, e legate all’uso agricolo (bassa/media esposizione) e/o come diserbante in generale, ma non legate alla produzione (alta esposizione).

Sono stati usati metodi statistici basati fondamentalmente sulla rappresentazione grafica più diffusa del “Forest Plot”.

L'analisi dei dati è stata condotta utilizzando il package statistico “CMA (Comprehensive Meta-Analysis), prodotto dalla società americana “BIOSTAT™” – New Jersey (USA)”. Inoltre, è stata condotta una ulteriore analisi simulando la rimozione di uno studio primario al fine di valutarne l'influenza sul risultato globale ottenuto.

6.6 Il Forest Plot

Il Forest plot è la rappresentazione grafica sia dei dati raccolti nei singoli studi inclusi nella revisione sistematica che il risultato globale della loro aggregazione quantitativa.

Questi studi, in genere, confrontano gli effetti dell'esposizione ad un determinato fattore di rischio in esame con lo sviluppo di una determinata patologia o effetto (standard). Nel nostro caso, il confronto è basato sugli effetti (Parkinson) derivanti dall'esposizione oppure no alla sostanza chimica “paraquat”.

Il grafico facilita la comprensione intuitiva dei risultati e fornisce nel contempo a chi lo legge con attenzione tutte le informazioni principali su obiettivi, modalità, e risultati della meta-analisi.

Il Forest Plot deve essere composto di tre elementi:

1. Elemento grafico composto da quadratini, linee orizzontali soprannominate “baffi”, una linea verticale e una losanga posizionata nella parte inferiore del grafico. Il quadratino più il “baffo” indicano rispettivamente la stima puntuale, cioè l'area proporzionale al peso dello studio, e il relativo intervallo di confidenza. La dimensione del quadratino, raffigura il peso con cui la stima contribuisce al risultato finale che è rappresentato dalla losanga, ottenuta “impulando” tutti i dati. Infatti, la “losanga” o “diamante” rappresenta la stima di sintesi ed il relativo “intervallo di confidenza” (IC).
2. Dati dei singoli studi: il numero degli eventi e dei partecipanti, sia per il gruppo dei casi, esposti alla sostanza chimica neurotossica, sia per il gruppo di controllo, non esposta a tale sostanza chimica.
3. Indicatori che descrivono la **variabilità** (la consistenza dei risultati) esistente fra i valori delle stime dei singoli studi (detta anche eterogeneità, in inglese *heterogeneity*). Gli indicatori si trovano in fondo alla tabella dei dati; generalmente sono rappresentati da un valore espresso in percentuale,

indicato con I^2 (I-squared), oppure con un valore numerico che viene spesso indicato con la lettera Q, o con la sigla Chi^2 (Chi-quadro); in quest'ultimo caso per l'interpretazione del valore è importante conoscere il numero degli studi sul quale è stato calcolato. La lettura di tali indicatori, consente l'esecuzione di interessanti analisi.

Il grafico è diviso in due da una linea verticale, detta di non significatività statistica (o nessun effetto), che indica l'assenza di differenze rilevabili negli effetti dei (soggetti) confrontati.

Gli studi le cui stime di effetto favoriscono la malattia, attraverso la non esposizione alla sostanza neurotossica, cadono, per convenzione, alla sinistra di questa linea, mentre quelli le cui stime favoriscono la malattia attraverso l'esposizione alla sostanza neurotossica cadono alla sua destra.

Semplicemente guardando da che parte del grafico si trova uno studio è possibile capirne gli esiti.

Ogni studio è rappresentato da una linea orizzontale con un quadratino al centro. La collocazione del quadratino indica la stima puntuale di effetto. La grandezza è invece proporzionale al peso che lo studio ha nella meta-analisi, a sua volta dipendente dal numero di partecipanti allo studio e dal numero di esiti verificatisi. La linea orizzontale indica l'intervallo di confidenza, ovvero il grado di incertezza dello studio. Tanto più grande è questa linea, tanto più i risultati sono incerti, potenzialmente attribuibili, cioè, al solo effetto del caso.

Se l'intervallo di confidenza attraversa la linea verticale, i risultati dello studio convenzionalmente vanno considerati come statisticamente non significativi ($\alpha=0.05$). Questo non significa che i risultati non siano “veri” o “validi”, ma piuttosto che il numero di soggetti analizzati nello studio non è sufficiente a garantire che i risultati siano indipendenti dal “caso”.

All'aumentare del numero dei partecipanti allo studio, l'intervallo di confidenza si riduce: ecco perché, spesso, per poter considerare i risultati di piccoli studi, è assolutamente necessario accorparli ad altri nel contesto di una meta-analisi, così da raggiungere un numero più elevato di soggetti. Gli studi con un elevato numero di soggetti, indicati da quadratini di grandi dimensioni, incidono maggiormente sul risultato complessivo della meta-analisi.

La meta-analisi, tramite il pooling dei risultati, permette di ottenere:

- una valutazione globale e quantitativa degli effetti dall'esposizione;
- una riduzione dell'incertezza.

Il risultato finale della meta-analisi è rappresentato da un simbolo a forma di “diamante” presente in basso al grafico: il centro indica la stima puntuale e complessiva dell'effetto, mentre l'ampiezza dei lati, l'intervallo di confidenza.

I risultati di una meta-analisi condotta con rigore rappresentano la “migliore evidenza” sull'efficacia di un trattamento disponibile. Tuttavia tali risultati non sono definitivi, e infatti includendo nuovi studi i risultati della meta-analisi potrebbero cambiare.

Pertanto, quando il quadratino è di grandi dimensioni, ciò sta a dimostrare che lo studio ha un gran peso nella stima complessiva, rappresentata dalla “losanga”. Inoltre, quando i “baffi” sono piccoli è indice di uno stretto intervallo di confidenza, cioè lo studio fornisce una stima precisa, perché gli eventi non sono rari e/o la numerosità campionaria è alta.

Come vedremo, l'eterogeneità rappresenta il grado di diversità fra le stime puntuali, cioè il grado di incompatibilità tra gli esperimenti inclusi nella revisione. Si osserva eterogeneità, o perlomeno la variabilità è degna di considerazione, quando $I^2 > 30\%$, oppure quando risulta > 1 il valore di Chi^2 (o Q) diviso per $N - 1$, dove N è numero degli studi meno inclusi nel *Forest Plot*.

Sul *Forest Plot* la presenza di eterogeneità è riscontrabile graficamente quando le stime puntuali (i quadratini) sono molto diverse per dimensione, ma coerenti per direzione; oppure quando sono differenti, sia in direzione che in grandezza. Qualora non siano riportati gli indici I^2 o Chi^2 , si può dare un'occhiata agli intervalli di confidenza delle diverse stime puntuali (i “baffi”). Se in parte si sovrappongono, oppure se sono separati tra loro, è segno di eterogeneità. Invece, quando le stime puntuali sono molto simili fra loro e i rispettivi intervalli di confidenza si sovrappongono per buona parte della loro larghezza, allora si dice che i risultati sono coerenti (consistenti).

6.7 Differenze di metodo e di modello

Due ulteriori elementi utili per interpretare correttamente i risultati di una meta-analisi, e di conseguenza il *Forest Plot*, sono il metodo e il modello utilizzati per

la sintesi complessiva delle stime dei singoli studi. La sintesi avviene attraverso una somma pesata delle singole stime, in genere le stime più precise (“baffi stretti”) pesano di più nella stima combinata (losanga nera).

I metodi indicati con MH (Mantel-Haentzel), Peto e IV (inverso della varianza), in genere, producono risultati molto simili. La differenza fra i metodi risiede nel modo con cui questi attribuiscono il peso alle singole stime per il calcolo della stima combinata.

I modelli, indicati come modello ad effetti fissi (*fixed effects*) e modello ad effetti casuali (*random effects*), possono produrre invece risultati molto diversi, a seconda se vi sia presenza o meno di eterogeneità. La differenza fra i due consiste proprio nell'escludere o includere l'eterogeneità nel calcolo della stima complessiva; infatti, quello ad effetti fissi esclude l'eventuale eterogeneità, mentre il modello ad effetti casuali la include e di conseguenza la stima complessiva così ottenuta avrà intervalli di confidenza più ampi.

6.8 Valore del test statistico di eterogeneità nel Forest Plot

Nel Forest Plot, l'indicatore del Chi-quadro è stato rappresentato in fondo alla tabella dei dati, ed indica la presenza di un'eventuale eterogeneità, cioè quando il valore del Chi quadro (o Q), diviso N-1 (dove N è il numero degli studi), risulta > 1.

Un altro indicatore di eterogeneità è il valore del P value (valore P): se il valore p > 0,05 indica l'assenza di eterogeneità, mentre se < 0,05 c'è eterogeneità.

Inoltre, l'inconsistenza descrive la percentuale della variabilità dell'effetto della stima, riferibile all'eterogeneità piuttosto che al caso. Se >50%, siamo in presenza di eterogeneità.

Infine, il valore Z Value (valore Z) è un valore standardizzato, formato sottraendo al valore rilevato la media, e poi dividendo il risultato dalla deviazione standard.

6.9 Test di eterogeneità

Il test di eterogeneità Cochran's Q:

$$Q = \sum_i w_i (\alpha_i - \mu)^2$$

Il modello ad effetti fissi pesa ogni studio con l'inversa della varianza:

$$\frac{\sum_{i=1}^k W_i Y_i}{\sum_{i=1}^k W_i}$$

con

$$W_i = \frac{1}{s_i^2}$$

Il modello ad effetti casuali pondera ogni studio con l'inverso della varianza campionaria più una costante che rappresenta una stima della variabilità tra gli effetti in popolazione:

$$\frac{\sum_{i=1}^k W_i(\tau) Y_i}{\sum_{i=1}^k W_i(\tau)}$$

con

$$W_i(\tau) = \frac{1}{s_i^2 + \hat{\tau}^2}$$

La stima è ottenuta con il metodo dei momenti⁹:

$$\hat{\nu}_\theta = \max\left(0, \frac{Q_T - (K - 1)}{\sum_i W_i - \left(\frac{\sum_i W_i^2}{W_i}\right)}\right)$$

Nella meta-analisi ad effetti casuali, suggerita nell'ipotesi di eterogeneità degli studi, il fattore di ponderazione di ciascuno studio riflette non solo la variabilità del singolo studio, ma anche il contributo di una misura dell'eterogeneità degli studi.

Quanto più tale misura di eterogeneità predomina la componente singola di variabilità, tanto più i pesi tenderanno ad essere simili.

6.9.1 Indice di eterogeneità di Higgins (I²)

L'indice di eterogeneità secondo il metodo di Higgins (I²) consente il confronto tra meta-analisi con outcome diversi e diverso numero di studi considerati. Pertanto, misura la proporzione di inconsistenze dei singoli studi che non può essere spiegata dall'errore di campionamento.

$$I^2 = \frac{Q - (df)}{Q}$$

I² è una percentuale e il valore può essere minimo 0% o massimo 100%. Valori negativi sono posti pari a 0 df = numero degli studi - 1.

⁹ DerSimonian R, Laird N. *Meta-analysis in clinical trials*. Control Clin Trials, 1986; 7(3), p. 177-188.

6.9.2 Indagare le cause di eterogeneità

La presenza di eterogeneità pone il problema di indagarne le cause. Infatti, quando gli studi differiscono in direzione e/o grandezza della stima, questo dovrebbe suggerire che possono esistere dei fattori importanti che influenzano l'efficacia dell'intervento.

Le principali fonti di eterogeneità che dovrebbero essere sempre tenute a mente, quando si legge sia un singolo studio, sia una revisione sistematica sono:

- Caratteristiche dei partecipanti (età, sesso, fenotipo, criteri di inclusione/esclusione);
- Caratteristiche dell'intervento (es. tipo di esposizione, tipo di sostanza venuta a contatto, dosaggio ecc.);
- Modalità di conduzione dello studio: tipo la definizione degli eventi di interessi (end-points) o la lunghezza del periodo di osservazione;
- Qualità metodologica della conduzione dello studio: qualità delle procedure di randomizzazione, dimensione campionaria, numero di casi o controlli persi di vista, esclusi o ritirati dopo l'inizio dello studio.

Purtroppo, non è sempre possibile fornire una spiegazione dell'eterogeneità osservata. A volte, a causa del numero esiguo di studi presenti, altre volte invece, perché nella presentazione dello studio, non si individuano i fattori importanti che spiegano le eventuali differenze fra le stime osservate nei singoli studi.

6.10 Prove di significatività

Quando si effettua un test di significatività statistica inizialmente si assume la cosiddetta “**ipotesi zero**” (o “**ipotesi nulla**”), secondo la quale non esiste nessuna differenza tra i gruppi riguardo al parametro considerato. Rappresenta lo “status quo”. Secondo l'ipotesi zero, i gruppi sono fra loro uguali e la differenza osservata va attribuita al caso. Ovviamente l'ipotesi zero può essere *vera* o *falsa*.

1^a ipotesi: ipotesi nulla vera, cioè gli odds ratio della popolazione sono uguali:

$$H_0: OR_1 = \dots = OR_2 = OR_i$$

2^a ipotesi: ipotesi nulla falsa, cioè gli odds ratio della popolazione non sono uguali:

$$H_0: OR_1 \neq \dots \neq OR_2 \neq OR_i$$

Per decidere se accettare o rifiutare l'ipotesi zero, si devono analizzare i dati con un **test statistico**. Se il test «consiglia» di rifiutare l'ipotesi zero, allora la differenza osservata viene dichiarata **statisticamente significativa**. Se invece il test ti «consiglia» di accettare l'ipotesi zero, allora la differenza è statisticamente non significativa.

Per eseguire il test, calcoliamo:

$$x^2 = \sum_{i=1}^i W_i (y_i - [Y])^2$$

in cui: y_i è il logaritmo dell'odds ratio stimato per la i -esima tabella, Y la media ponderata dei singoli i logaritmi degli odds ratio e W_i è il fattore di ponderazione per la i -esima tabella.

I risultati di un test statistico non hanno un valore di assoluta e matematica certezza, ma soltanto di **probabilità**. Pertanto, una decisione di respingere l'ipotesi zero è **probabilmente** giusta, ma potrebbe essere errata. La misura di questo rischio di cadere in errore si chiama «**livello di significatività**» del test.

Il livello di significatività di una prova può essere scelto. Tuttavia, di solito si sceglie un livello di probabilità di 0.05 (5%) o di 0.01 (1%). Questa probabilità (detta **valore P**) rappresenta una stima quantitativa della probabilità che le differenze osservate siano dovute al caso.

Notare che P è una probabilità e quindi può assumere solo valori compresi fra 0 e 1. Un valore P che si avvicina a 0 testimonia una bassa probabilità che la differenza osservata possa essere ascritta al caso.

Il livello di significatività 5% viene adottato molto frequentemente, in quanto si ritiene che il rapporto 1/20 (cioè 0.05) sia sufficientemente piccolo da poter concludere che sia piuttosto improbabile che la differenza osservata sia dovuta al semplice caso.

Infine, è necessario sottolineare un concetto molto importante: «statisticamente significativo» non vuol dire importante o di grande interesse o rilevante. «Statisticamente significativo» significa semplicemente che ciò è stato osservato è difficilmente dovuto al caso.

Numerosi test statistici vengono usati per determinare con un certo grado di probabilità, l'esistenza (o l'assenza) di differenze significative nei dati in esame o meglio, più in generale, di accettare o rigettare una ipotesi zero.

6.11 Il test del chi-quadro (o chi-quadrato)

Come accennato, un test di significatività statistica è un passo *indispensabile* nel confronto fra due gruppi o popolazioni, riguardo ad un parametro.

Come test di significatività può essere usato uno dei test più comuni e più semplici, quali il test del chi-quadro (o chi-quadrato):

$$\chi^2 = \frac{(ad - [bc])^2 n}{(a + b)(a + c)(b + d)(c + d)}$$

Questo test fra i molti disponibili, oltre che di semplice applicazione, permette di verificare se le proporzioni di successi e di insuccessi nei x gruppi sono indipendenti dall'esposizione alla quale sono sottoposti, oppure se esiste associazione tra essi.

Tutti i metodi che si basano su distribuzioni probabilistiche dei dati, quali la distribuzione normale, sono detti parametrici. In contrapposizione, le tecniche non parametriche sono quelle che non sono basate su alcuna distribuzione probabilistica.

Il test del chi-quadro è un test statistico non parametrico atto a verificare se i valori di frequenza ottenuti tramite rilevazione sono diversi in maniera significativa dalle frequenze ottenute con la distribuzione teorica. Questo test ci permette di accettare o rifiutare una data ipotesi.

La magnitudine del chi-quadrato è determinata dalla differenza fra i numeri osservati ed i numeri attesi, nel caso in cui i due tipi di parametri (esposizione e non esposizione; malato e non malato) avessero avuto lo stesso effetto. La differenza al numeratore della frazione viene elevata al quadrato; ciò elimina i numeri negativi che possono comparire quando il numero osservato è minore di quello atteso. Poi il quadrato della differenza viene diviso per il numero atteso; in questo modo la differenza per ogni cella viene aggiustata in rapporto al numero di individui della stessa cella.

Pertanto, calcoliamo il chi-quadrato come segue:

$$\frac{(\text{dato osservato} - [\text{dato atteso}])^2}{\text{dato atteso}}$$

È evidente che il chi-quadrato aumenta con l'aumentare della differenza dei dati posti a raffronto. Se esso supera certi valori prefissati, la differenza viene ritenuta

significativa; in caso contrario, non si può affermare l'esistenza di una significativa differenza tra i due eventi considerati.

Il grado di libertà è uguale a (numero di righe-1)*(numero di colonne-1).

Il metodo del chi-quadrato è utilizzabile quando il valore contenuto in ogni cella è >5, ed il numero totale di osservazioni è >30; in caso contrario, occorre usare altri test (ad esempio, il test di Fisher).

Comunque un principio generale valido sempre è che qualsiasi test di significatività non può mai provare con certezza che una ipotesi zero è vera o falsa; esso può solo fornire una indicazione della forza, con cui i dati contrastano l'ipotesi zero.

Quando le frequenze attese sono basse (ma sempre >5) è consigliabile utilizzare una formula del chi-quadrato modificata secondo quanto proposto da F. Yates¹⁰ nel 1934:

$$\chi_{\text{corretto Yates}}^2 = \frac{\left(|ad - bc| - \left[\frac{n}{2}\right]\right)^2 n}{(a+b)(a+c)(b+d)(c+d)}$$

¹⁰ Yates F. *Contingency tables involving small numbers and the χ^2 test?* J R Stat Soc., 1934; Suppl. 1, p. 217-235.

CAPITOLO 7

RISULTATI

Sono stati analizzati circa settanta studi secondo le metodiche indicate al capitolo precedente. Alcuni di essi (all'incirca cinquanta) sono stati esclusi, perché l'esposizione era riportata esclusivamente su scala qualitativa (basata sui job-title); altri sono stati esclusi poiché l'esposizione riguardava altri tipi di pesticidi utilizzati, o perché non era particolarmente riferito all'uso di un diserbante specifico, quale il "paraquat", oggetto di questo studio.

7.1 Analisi dei dati complessivi

Il "Forest plot" ottenuto dalla meta-analisi condotta sugli studi primari presi in considerazione (Tab. 1) ha messo in mostra un Effect size "fixed" pari a 1,742 (IC 1,489 – 2,038) ed un Effect size "Random" pari a 2,202 (IC 1,482 – 3,273). Inoltre, si riscontra rispettivamente un Tau di 0,547 ed uno Z-value (standardizzazione dell'OR) pari a 6,927 nel modello "Fixed" e 3,906 nel modello "Random". Infine, un P-value (significatività dell'OR corrispondente) pari a 0,000 in entrambi i modelli per il Test di nullità (o ipotesi nulla) (Tab. 2).

La valutazione della correlazione pesata fra precisione (inverso della deviazione standard) ed effetti standardizzati mostra la *presenza di una significatività* statistica e le caratteristiche numeriche sono indicate in Tab. 3.

La meta-analisi indica che il test Q-value per l'eterogeneità è pari a 48,655 con P-value di 0,000.

L'analisi stratificata fra i diversi studi primari è rappresentata in Fig. 1.

Sul grafico n. 2, viene indicata la posizione dell'effect size dato dal quadrato di ogni studio. Il rombo è l'effect-size globale che si è calcolato, cioè l'effect-size pesato di tutti gli studi; mentre le barre sono gli Intervalli di Confidenza (IC) pesati al 95%. La grandezza del quadrato rappresenta il peso dello studio corrispondente, rispetto a tutti gli altri studi. Il peso del singolo studio è il risultato (o è dato) dell'ampiezza dell'IC, infatti più l'IC è stretto, più lo studio pesa. Formula utilizzata per calcolare i pesi di ogni singolo studio, e cioè l'effect-size globale, è:

$$\theta = \frac{\mu_1 - \mu_2}{\sigma}$$

e precisamente, θ rappresenta la dimensione dell'effetto (o effect size), dato dalla differenza media standardizzata tra due popolazioni.

Dalla varianza (IC) dello studio si calcola il peso, che rappresenta l'inverso della varianza; pertanto, gli studi che avranno la varianza più piccola avranno di conseguenza il peso maggiore [varianza piccola = intervallo di confidenza piccolo]. Pertanto, sono quelli che a livello dell'effect-size globale permettono di avvicinarsi di più al valore medio degli studi che hanno una varianza minore. Ad es. gli studi di "Hancock et al.", "Gatto et al.", "Castello et al.", sono quelli che nel grafico hanno un quadratino più grande (studi che pesano di più), e presentano un effect-size abbastanza vicini ed allineati tra di loro. Non è un caso che l'effect-size globale è in linea con questi tre studi. Inoltre questi tre studi insieme pesano probabilmente molto più di tutti gli altri, perché hanno anche IC (intervalli di confidenza) molto ristretti.

7.3 Interpretazione dei risultati

Gli studi primari considerati hanno calcolato ciascuno un OR (odds ratio), e il risultato finale è espresso in OR, pari a 1,742 con il modello "Fixed" e 2,202 con il modello "Random". Il primo (Fixed) viene usato quando si ha una ragionevole certezza che il/i proprio/i studio/i primario/i sia stato condotto con la stessa modalità, cioè secondo la stessa metodologia, simile se non proprio uguale. Questo è il caso degli studi epidemiologici considerati in questa meta-analisi, e cioè studi che hanno preso in esame in tutta la popolazione quanti erano ammalati di Parkinson e quanti non lo erano, e al loro interno chi era stato esposto al "paraquat" e chi invece no.

L'OR globale calcolato col modello "fixed" è di 1.76 (Tab. 3) sta a significare che negli esposti a quel fattore di rischio la probabilità di sviluppare la malattia è di 1.76 volte (rischio modesto).

Mentre l'OR calcolato con la metodica "random" è 2.202 (Tab. 3), valore più alto rispetto a quello "fixed", anche se ci sono dei cut-off.

Le due modalità non cambiano complessivamente nel valore totale e di interpretazione del valore numerico di risultato ottenuto, anche perché il cut-off è più o meno simile, mentre una piccola differenza è stata registrata tra i due

modelli, così come l'IC risulta più ristretto nel primo e più ampio nel secondo metodo.

Il P-value, sia nel modello “fixed” che in quello “random”, è pari a 0,000, ciò sta a dimostrare appunto la significatività degli studi.

Q-value, I-squared, Tau-squared e Tau misurano un parametro che è l'eterogeneità; in particolare, Tau misura la quota di varianza che è attribuibile veramente all'effetto che si sta misurando (e cioè toglie l'errore dalla quota di varianza) misura quella .Q-value è un indice finalizzato a dimostrare se l'eterogeneità è significativa oppure no. In questo studio il Q-value di 48,655 ed è significativo, indicando che gli studi hanno un'altra eterogeneità.

$I^2 = (I\text{-squared})$, calcolato tramite una formula in percentuale ($I^2 = 100 * (Q - df) / Q = 79.447$, dove $df (Q) = \text{grado di libertà}$) ci dice che c'è una eterogeneità alta, pari al 79%.

7.4 Altro studio effettuato (study removed)

Di solito, quando si è in presenza di risultati contraddittori e/o di una situazione instabile, è sufficiente togliere o inserire uno studio per far cambiare radicalmente i risultati¹. Nel nostro caso, invece, tale situazione non si verifica quando uno studio viene rimosso. Tale analisi consiste nella valutazione di tutti gli studi con l'esclusione di uno degli studi primari oggetto dell'analisi. Ad es., eliminando lo studio di “Hertzman et al.”, l'OR diventerebbe da 1,742 a 1,754 e così via. Questa è una prova indiretta che tutti gli studi primari presi in considerazione nello studio hanno una loro attendibilità. In pratica non si hanno degli stravolgimenti nello studio, anzi sono quasi identici e ciò si verifica anche sia nello studio che presenta un'alta numerosità di soggetti, così come nello studio che presenta un ampio IC.

¹ Jefferson T, Zarra L. *Bufale spotting, Part 10: Assessing a journal*. J R Soc Med., 2008; 101(5), p. 235-236.

CAPITOLO 8

DISCUSSIONE

Lo studio di meta-analisi condotto è stato finalizzato ad indagare la possibile correlazione tra esposizione al paraquat e sviluppo del morbo di Parkinson. Tale sostanza, anche se è stata revocata dal commercio europeo, risulta ancora largamente utilizzata in agricoltura in altri paesi, specie in quelli in via di sviluppo. **Questo studio ha messo in evidenza, così come confermato da diversi studi pubblicati, che il rischio di sviluppare il Parkinson è più alto nei soggetti che vivono in aree rurali esposti di continuo ai pesticidi, i quali possono ristagnare nell'area oggetto del trattamento a causa delle condizioni meteorologiche, come anche contaminare gli alimenti attraverso il suolo e le acque sottostanti, sino a giungere nelle falde acquifere.**

Si deve rilevare che nonostante in letteratura siano presenti diversi studi sull'associazione tra esposizione a pesticidi e sviluppo di malattie neurodegenerative, appare esigua la quantità di studi controllati che mettono in relazione l'esposizione al paraquat e lo sviluppo del morbo di Parkinson.

Dalla revisione della letteratura scientifica fin qui pubblicata ci risulta che quella realizzata nella presente tesi è la prima meta-analisi degli studi osservazionali di associazione tra Paraquat e morbo di Parkinson. Il lavoro di meta-analisi condotto ha messo in mostra una modesta/moderata associazione fra Parkinson ed esposizione al pesticida/erbicida “paraquat” (Fig. 2). La significatività di tale associazione è stata confermata anche da un altro approccio statistico denominato “**study removed**” (Fig. 3). Inoltre, non vi è una sostanziale differenza tra modello “Fixed” e modello “Random” di meta-analisi; ovvero non vi è una differenza statisticamente significativa nell'associazione tra paraquat e Parkinson (Tab. 3) ottenuta con il modello fisso rispetto a quello casuale. In questi contesti meta-analitici, i modelli “fixed” sono più appropriati rispetto ai modelli “random”, poiché, come precedentemente affermato, il modello degli effetti “fixed” si basa su valori di OR di tipo retrospettivo, il quale si adatta meglio ai dati e rappresenta la scelta migliore rispetto a quello casuale.

Il risultato della modesta associazione tra paraquat e Parkinson va comunque considerato con cautela per le motivazioni che seguono. Innanzitutto, va considerata la possibilità di un bias di *pubblicazione*. La selezione di pubblicazioni di risultati positivi negli studi osservazionali è una preoccupazione importante nelle rassegne sistematiche della letteratura, perché qui è maggiormente elevata la probabilità che appaiano più studi riportanti associazioni positive ed è meno probabile che si riportino studi, ugualmente validi, ma negativi.

La registrazione di diverse meta-analisi in un unico database è la soluzione del problema, ma la possibilità di completare tali database nel prossimo futuro, nonostante i diversi tentativi, è lontana. Tale esperienza attualmente è evidente nel "Cochrane Database of Systematic Reviews" a cui abbiamo accennato precedentemente.

Altra fonte di bias possono essere la *lingua* (la pubblicazione preferenziale di studi negativi in riviste non inglesi fa diventare l'inclusione di questi studi meno probabile) e il tipo di indagine condotta. Anche le *differenze nella qualità metodologica* possono essere fonte di bias. I piccoli studi hanno di solito un rigore metodologico inferiore, rispetto ai grandi studi, e la loro tendenza è quella di mostrare grandi effetti.

Inoltre, in molte situazioni non è possibile effettuare studi randomizzati e sono disponibili soprattutto studi osservazionali¹. Questo è vero anche per la medicina del lavoro. In effetti, gli studi su fattori di rischio non possono essere interventistici in quanto essi sono inerenti a "caratteristiche" o pratiche umane, e la esposizione dei soggetti a tali fattori di rischio non è eticamente accettabile². Dunque, sebbene le meta-analisi ristrette ai RCT sono preferite, il numero di quelle relative agli studi osservazionali è in continuo aumento. Solo nel 1996 sono state effettuate più di 400 meta-analisi di studi osservazionali³. Pertanto, in assenza di grandi studi di intervento, le rassegne sistematiche degli studi

¹ Berlin JA. *Does blinding of readers affect the results of meta-analyses? University of Pennsylvania Meta-analysis Blinding Study Group*. Lancet, 1997; 350(9072), p. 185-186.

² Ioannidis JP, Lau J. *Pooling research results: benefits and limitations of meta-analysis*. Jt Comm J Qual Improv., 1999; 25(9), p. 462-469.

³ Stroup DF, et al. *Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group*. JAMA, 2000; 283(15), p. 2008-2012.

osservazionali sono la migliore strategia per implementare la medicina basata sull'evidenza.

CAPITOLO 9

CONCLUSIONI

La tutela della salute, che è l'obiettivo cardine delle attività di prevenzione, non può essere attuata senza prendere in considerazione l'ampio intreccio di rapporti che si sviluppa tra l'ambiente e l'uomo. Infatti, oggi è ormai largamente dimostrato che nella comparsa di un sempre maggior numero di patologie l'ambiente gioca un ruolo eziologico di primaria importanza.

La conoscenza della distribuzione delle malattie sul territorio è fondamentale, sia per l'evidenziazione dei bisogni di salute e quindi per la programmazione degli interventi che possono essere mirati e finalizzati, sia per la formulazione di ipotesi circa l'eziologia delle malattie.

Le difficoltà che si incontrano prevalentemente sono l'identificazione dei determinanti causali che minano lo stato di salute della popolazione, in quanto l'uomo si espone contemporaneamente a diversi ambienti, tutti spesso con caratteristiche differenti.

Per la comprensione dei rapporti tra ambiente e salute, si devono progettare ed intraprendere studi di diverso tipo che consentano, da un lato, di evidenziare l'entità e la distribuzione dei fenomeni morbosi, delle cause di morte e dei fattori di rischio presenti sul territorio, e, dall'altro, di valutare l'eventuale associazione tra stato di salute e fattori di rischio.

Va sottolineato il fatto che questi studi non sono in grado di dimostrare che una determinata patologia sia sicuramente attribuibile ad un determinato fattore di rischio, ma possono stabilirne l'eventuale associazione, indicando, attraverso analisi statistiche, il livello di probabilità che lega assieme i due eventi.

Per uno studio di valutazione dell'esposizione a fattori di rischio di una popolazione, è necessario quindi effettuare primariamente una descrizione dello stato di salute della stessa e della presenza sul territorio, in senso lato, dei fattori di rischio ritenuti tali dalla letteratura scientifica o da proprie esperienze. Tra i fattori di rischio non vanno comunque trascurati quelli legati alle abitudini

comportamentali del soggetto, e quelli legati alla condizione socioeconomica e culturale.

Va tuttavia ricordato quanto importante sia la percezione del rischio da parte della popolazione: spesso infatti, per motivi facilmente individuabili (quali, ad esempio, la pressione esercitata dai mass-media), la percezione del rischio da parte del pubblico è molto diversa dalla sua reale entità, per cui i responsabili delle scelte di sistema ed i gestori della salute pubblica si trovano a dover decidere se procedere razionalmente o “favorire i pregiudizi” dell’opinione pubblica. Da ciò emerge anche la grande importanza della corretta comunicazione del rischio.

I temi d’interesse, sui quali appare prioritario raggiungere un’omogeneità tra Enti preposti alla tutela dell’ambiente e della salute, risultano essere:

- a) La valutazione del rischio ambientale e sanitario;
- b) La definizione delle priorità in materia di tutela della “salute ambientale”;
- c) Le strategie di comunicazione del rischio e di coinvolgimento dei cittadini;
- d) La stesura di protocolli condivisi di gestione (management) del rischio.

Infatti, gli autori Grandjean e Landrigan¹ affermano che è sempre meglio prevenire l’insorgere di una malattia. Un ambiente più pulito, migliori abitudini alimentari, uno stile di vita salutare e la diagnosi tempestiva delle malattie comuni riducono i costi sanitari e conducono a una migliore qualità della vita, cioè ad una minore incidenza delle malattie.

La valutazione dei possibili effetti sul sistema nervoso dell’esposizione a neurotossine presenti sia in ambiente di lavoro che di vita si configura per l’intera comunità scientifica come una sfida, iniziata circa trenta anni fa, sia per le difficoltà nell’individuare una metodologia di studio affidabile^{2,3}, sia perché i possibili effetti sullo stato di salute sono molto variabili.

¹ Grandjean P., Landrigan PJ., *Developmental neurotoxicity of industrial chemicals*, The Lancet, 2006, 368(9553), p. 2167-78.

² Paulson GW. *Environmental effects on the central nervous system*. Environ Health Perspect., 1977; 20, p. 75-96.

³ Ritz B. *Environmental toxins and neurodegenerative diseases: a challenge for epidemiologists*. Epidemiology, 2006; 17(1), p. 2-3.

In linea con le moderne tendenze dell'epidemiologia ambientale, anche per quanto riguarda i possibili effetti delle neurotossine, è necessario definire il rapporto che queste hanno con i fattori genetici⁴.

La maggior parte degli studi effettuati negli ultimi dieci anni raggiungono un buon standard di qualità e mostrano una associazione statisticamente significativa tra l'esposizione al "paraquat" e l'insorgenza della malattia di Parkinson. La variabilità di questa associazione, comunque, può essere attribuita alla selezione dei casi e dei controlli, alla numerosità del campione, alla valutazione dell'esposizione (tipo di questionario utilizzato, uso di matrici esposizioni-occupazioni, attribuzione dell'esposizione da parte di un igienista ecc..), al tipo di analisi statistica effettuata, al controllo di possibili fattori confondenti (sesso, età, fumo di sigaretta). Nonostante questa mole di dati, non si è ancora riusciti a dimostrare con grande certezza un nesso causale; è comunque importante sottolineare che questa associazione sembra abbastanza riproducibile, poiché è stata osservata da autori diversi in tempi e luoghi differenti. Inoltre, i risultati della meta-analisi presentati nella presente tesi sembrano confermare tale associazione, anche quando si effettua l'analisi statistica denominata "study removed".

La presenza di una elevata eterogeneità nella meta-analisi riportata anche in presenza di una significatività statistica, pone il problema di indagarne le cause. In particolare vanno ulteriormente indagati fattori interferenti e confondenti, e le metodologie di indagine adottate che devono essere più omogenee e comparabili tra loro (suddivisione della popolazione in sottogruppi, in base alle realtà geografiche, demografiche, lavorative ecc...). Altro fattore di eterogeneità può essere la mancanza di un metodo standardizzato per l'individuazione dei soggetti professionalmente esposti. Infatti alcuni autori individuano i soggetti in base all'iscrizione in liste presenti nei registri delle patologie rare, altri in base alle modalità di esposizione o sulla base di questionari, ed altri ancora servendosi di ulteriori metodi soggettivi. Infine, un altro fattore presumibilmente responsabile dell'eterogeneità riscontrata è la familiarità.

⁴ Sun F, et al. *Environmental neurotoxic chemicals-induced ubiquitin proteasome system dysfunction in the pathogenesis and progression of Parkinson's disease*. Pharmacol Ther., 2007; 114(3), p. 327-344.

Le proiezioni demografiche indicano per i prossimi decenni un aumento dell'età media nella popolazione generale, non solo nei paesi occidentali, ma anche in quelli in via di sviluppo. Ciò significa che probabilmente bisogna attendersi un aumento consistente del numero di casi di malattie neurodegenerative e in particolare di parkinsonismi. Il numero ed il livello degli studi epidemiologici condotti sui parkinsonismi, negli ultimi tre decenni, sottolineano la necessità inderogabile di un approccio multidisciplinare a questa attività di ricerca. In particolare, va incrementata la ricerca sugli effetti combinati del paraquat in associazione con altre sostanze chimiche e queste con i ROS (radicali stress ossidati), in grado di danneggiare il sistema nervoso e quindi favorire gli effetti delle sostanze neurotossiche.

Solo da uno studio ben disegnato e condotto, dove possano convergere le competenze dell'epidemiologo, del clinico, dello statistico e del genetista, potranno derivare contributi utili alla conoscenza dei meccanismi patogenetici alla base delle malattie neurodegenerative.

Una considerazione finale a questa tesi è che ai fini di una maggiore diffusione e valorizzazione degli studi osservazionali, di uso sempre più frequente come prove di efficacia di "best practice" (buona pratica) nella prevenzione, potrebbe essere di grande utilità l'introduzione della meta-analisi e degli studi meta-analitici nei piani di studio dei corsi di laurea in "Scienze delle professioni sanitarie della prevenzione".

TABELLE E GRAFICI

Tabella 1: Elenco degli studi primari selezionati ed inclusi nella meta-analisi.

id	Study	Year	Country	Cases Exposed	Cases non Exposed	Total cases	Controls Exposed	Controls non Exposed	Total controls	Odds Ratio	Lower IC 95%	Upper IC 95%
1	Hertzman et al.	1994	Canada	6	121	127	5	116	121	1,11	0,32	3,87
2	Liou et al.	1997	Taiwan	31	89	120	22	218	240	3,22	2,41	4,31
3	Engel et al.	2001	Usa	20	29	49	5	239	244	0,8	0,5	1,3
4	Firestone et al.	2005	Usa	2	154	156	2	239	241	1,7	0,2	12,8
5	Kamel et al.	2007	Usa	11	72	83	7385	48549	55934	1	0,5	1,4
6	Hancock et al.	2008	Usa	200	119	319	147	149	296	1,58	1,11	2,27
7	Ritz et al.	2009	Usa	38	286	324	15	319	334	2,8	1,52	5,25
8	Gatto et al.	2009	Usa	158	131	289	141	140	281	1,15	0,82	1,62
9	Tanner et al.	2009	Usa	9	13	22	4	29	33	2,8	0,81	9,72
10	Costello et al.	2009	Usa	110	232	342	75	240	315	1,52	1,08	2,14
11	Rugbjerg et al.	2010	Canada	33	370	403	19	386	405	1,82	0,97	3,4

Tabella 2: Risultati della meta-analisi suddivisi per tipo di modello studiato – “Fixed” e “Random”.

Meta-Analysis		Effect size and 95% interval			Test of null (2-Tail)		Heterogeneity				Tau-squar	Tau-squared		
Model	Number Studies	Point estimate	Lower limit	Upper limit	Z-value	P-value	Q-value	df (Q)	P-value	I-squared	Tau Squared	Standard Error	Variance	Tau
Fixed	11	1,742	1,489	2,038	6,927	0,000	48,655	10	0,000	79,447	0,299	0,210	0,044	0,547
Random	11	2,202	1,482	3,273	3,906	0,000								

Tabella n. 3: Elenco degli studi primari selezionati e test di eterogeneità.

Meta-analysis: odds ratio

Variable for studies	Study
1. Intervention groups	
Variable for total number of cases	Total_cases Total cases
Variable for number of positive cases	Cases_Exposed Cases Exposed
2. Control groups	
Variable for total number of cases	Total_controls Total controls
Variable for number of positive cases	Controls_Exposed Controls Exposed

Study	Intervention	Controls	Odds	95% CI
Hertzman et al.	6/127	5/121	1,150	0,342 to 3,873
Liou et al.	31/120	22/240	3,451	1,895 to 6,285
Engel et al.	20/49	5/244	32,966	11,501 to 94,493
Firestone et al.	2/156	2/241	1,552	0,216 to 11,133
Kamel et al.	11/83	7385/55934	1,004	0,532 to 1,895
Hancock et al.	200/319	147/296	1,704	1,235 to 2,350
Ritz et al.	38/324	15/334	2,826	1,522 to 5,245
Gatto et al.	158/289	141/281	1,198	0,862 to 1,664
Tanner et al.	9/22	4/33	5,019	1,305 to 19,309
Costello et al.	110/342	75/315	1,517	1,075 to 2,141
Rugbjerg et al.	33/403	19/405	1,812	1,012 to 3,243
Total (fixed effects)	618/2234	7820/58444	1,760	1,510 to 2,052
Total (random effects)	618/2234	7820/58444	2,202	1,482 to 3,273

Test for heterogeneity

Q	48,6717
DF	10
Significance level	P < 0,0001

Calcoliamo anche l'indice I^2 (I-squared): $I^2 = 100*(Q-df)/Q = 79,447$

Figura n. 1: “Forest plot” con indicazione della linea verticale per la “*significatività statistica*”.

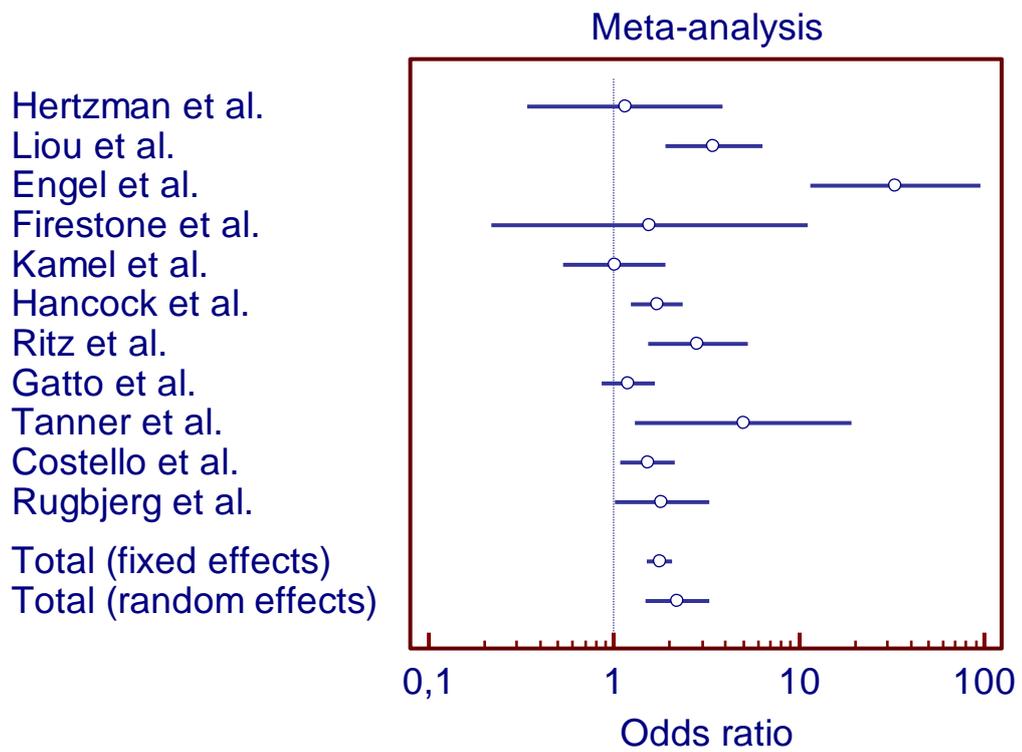
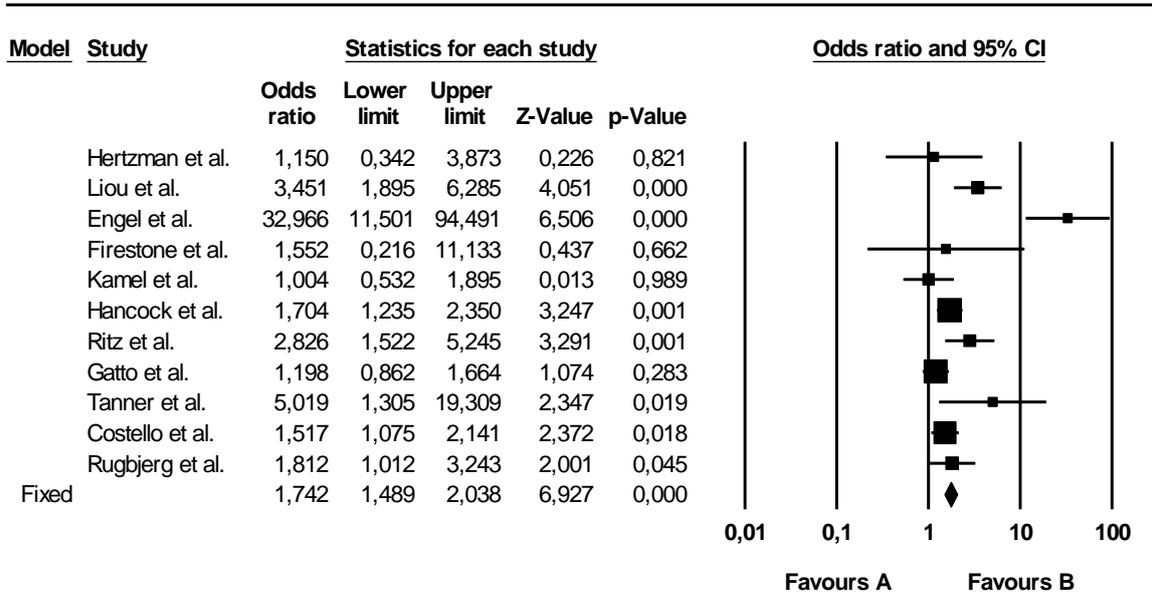
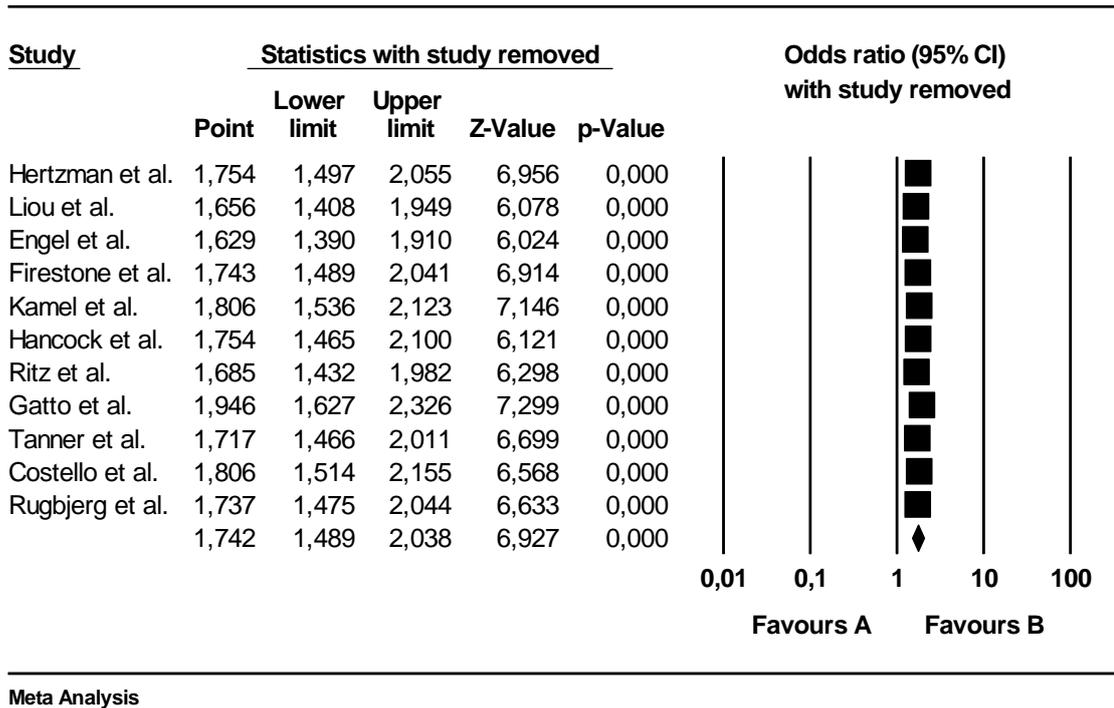


Figura n. 2: “Forest plot” completo di tutti gli studi primari e dell’OR globale ottenuto con il metodo “fixed”.



Meta Analysis

Figura n. 3: One study removed. “Forest plot”, ottenuto attraverso l’ipotesi di rimozione di uno studio primario dall’elenco.



BIBLIOGRAFIA

- Agency for Health Care Policy and Research. *Evidence – based practice centers: overview*. Rockville MD. 1998.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *National exposure registry policies and procedures manual (revised)*. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 1994.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Public health assessment guidance manual*. Chelsea, Michigan: Lewis Publishers. 1992.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Health assessment guidance manual*. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services. 1990.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Proceedings of the National Minority Health Conference: focus on environmental contamination*. Princeton, New Jersey: Princeton Scientific Publishing Co. 1992.
- Ahlbom A. *Biostatistics for epidemiologists*. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers. 1993.
- Akobeng AK. *Understanding systematic reviews and meta-analysis*. Arch Dis Child., 2005; 90(8), p. 845-848.
- Aldrich T, Griffith J. *Environmental Epidemiology and Risk Assessment*. Van Nostrand Reinhold, New York, 1993.
- Allen IE, Olkin I. *Estimating time to conduct a meta-analysis from number of citations retrieved*. JAMA, 1999; 282 (7), p. 634-635.
- Allpress JL, Curry RJ, Hanchette CL, Phillips MJ, Wilcosky TC. A GIS-based method for household recruitment in a prospective pesticide exposure study. Int J Health Geogr., 2008; 7(18), p. 1-12.
- Alphs HH, Schwartz BS, Stewart WF, Yousem DM. *Findings on brain MRI from research studies of occupational exposure to known neurotoxicants*. AJR Am J Roentgenol., 2006; 187(4), p. 1043-1047.
- Ambrosi L, Foà V. *Trattato di medicina del lavoro*. Torino, UTET Ed. 1996.
- Ames BN. *Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer*. Science. 1979; 204(4393), p. 587-593.
- Andersen JK. *Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence?* Nat Med., 2004; 10 (Suppl), p. 18-25.
- Anderson C, Checkoway H, Franklin GM, Beresford S, Smith-Weller T, Swanson PD. *Dietary factors in Parkinson's disease: the role of food groups and specific foods*. Mov Disord., 1999; 14(1), p. 21-27.
- Anderson YB, Coulberson SL, Phelps J. *Overview of the EPA/NIEHS/ATSDR workshop – "Equity in environmental health: research issues and needs"*. Toxicol Ind Health, 1993; 9(5), p. 679-683.

- Anello C, Fleiss JL. *Exploratory or analytic meta-analysis: should we distinguish between them?* J Clin Epidemiol., 1995; 48(1), p. 109-118.
- Annstrong B *Study design for exposure assessment in epidemiological studies.* Working paper presented at WHO Consultation on methodology for assessment of exposure to environmental factors in application to epidemiological studies, Stockholm. 1993.
- Antonovsky A. *A salutogenic model as a theory to guide health promotion.* Health Promot Int., 1996; 11(1), p. 11-18.
- Arcury TA, Marin A, Snively BM, Hernandez-Pelletier M, Quandt SA. *Reducing farmworker residential pesticide exposure: evaluation of a lay health advisor intervention.* Health Promot Pract., 2008; 10(3), p. 447-455.
- Armitage CJ, Conner M. *Efficacy of a minimal intervention to reduce fat intake.* Soc Sci Med., 2001; 52(10), p. 1517-1524.
- Armon C. *Environmental risk factors for amyotrophic lateral sclerosis.* Neuroepidemiology. 2001; 20(1), p. 2-6.
- Armstrong BK, White E, Saracci R. *Principle of exposure measurement in epidemiology.* Oxford University Press, New York. 1992.
- Armstrong RJ, Barker RA. *Neurodegeneration: a failure of neuroregeneration?* Lancet, 2001; 358(9288), p. 1174–1176.
- Aruoma OI, Grootveld M, Baborun T. *Free radicals in biology and medicine: from inflammation to biotechnology.* Biofactors, 2006; 27(1-4), p. 1-3.
- Ascherio A, Chen H, Weisskopf MG, O'Reilly E, McCullough ML, Calle EE, Schwarzschild MA, Thun MJ. *Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease.* Ann Neurol., 2006; 60(2), p. 197-203.
- Atkins D, DiGuseppi CG. *Broadening the evidence base for evidence-based guidelines: a research agenda based on the work of the U. S. Preventive Services Task Force.* Am J Prev Med., 1998; 14(4), p. 335– 344.
- Autere JM, Moilanen JS, Myllyla W, Majamaa K. *Familial aggregation of Parkinson's disease in a Finnish population.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2000; 69(1), p. 107-109.
- Axelsson O. *The "case-control" study: valid selection of subjects.* J Chronic Dis, 1985; 38, p. 553-555.
- Baghurst PA, McMichael AJ, Wigg NR, Vimpani GV, Robertson EF, Roberts RJ, Tong SL. *Environmental exposure to lead and children's intelligence at the age of seven years.* N Engl J Med., 1992; 327(18), p. 1279-1284.
- Baker DB, Loo S, Barker J. *Evaluation of human exposure due to the heptachlor epoxide contamination of milk in Hawaii.* Hawaii Med J., 1991; 50(3), p. 108-118.
- Baker EL, Melton RJ, Stange PV, Fields ML, Koplan JP, Guerra FA, Satcher D. *Health reform and the health of the public: forging community health partnerships.* JAMA, 1994; 272(16), p. 1276–1282.

- Baker F. *Risk communication about environmental hazards*. J Public Health Policy. 1990; 11(3), p. 341-359.
- Baker SR, Williamson CF. *The effects of pesticides on human health. Advances in modern environmental toxicology*. Princeton, NJ: Princeton Scientific. 1990, vol. 18.
- Baldereschi M, Di Carlo A, Vanni P, Ghetti A, Carbonin P, Amaducci L, Inzitari D, Italian Longitudinal Study on Aging Working Group. *Lifestyle-related risk factors for Parkinson's disease: a population-based study*. Acta Neurol Scand., 2003; 108(4), p. 239-244.
- Baldi I, Lebailly P, Mohammed-Brahim B, Letenneur L, Dartigues JF, Brochard P. *Neurodegenerative diseases and exposure to pesticides in the elderly*. Am J Epidemiol., 2003; 157(5), p. 409-414.
- Ballard TJ, Calvert GM. *Surveillance of acute occupational pesticide-related illness and injury: the US experience*. Ann Ist Super Sanità, 2001; 37(2), p. 175-179.
- Barbeau A, Roy M, Cloutier T, Plasse L, Paris S. *Environmental and genetic factors in the etiology of Parkinson's disease*. Advances of Neurology. 1986; 45, p. 299-306.
- Barkhatova VP, Zavalishin IA, Askarova LSh, Shavratskii VKh, Demina EG. *Changes in neurotransmitters in multiple sclerosis*. Neurosci Behav Physiol., 1998; 28(4), p. 341-344.
- Barlow BK, Richfield EK, Cory-Slechta DA, Thiruchelvam M. *A fetal risk factor for Parkinson's disease*. Dev Neurosci., 2004; 26(1), p. 11-23.
- Baron JA. *Cigarette smoking and Parkinson's disease*. Neurology, 1986; 36(11), p. 1490-1496.
- Barreto ML. *Efficacy, effectiveness and the evaluation of public health interventions*. J Epidemiol Community Health, 2005; 59(5), p. 345-346.
- Bauer G, Davies JK, Pelikan J. *The EUHPID Health Development Model for the classification of public health indicators*. Health Promot Int., 2006; 21(2), p. 153-159.
- Baujat B, Mahé C, Pignon JP, Hill C. *A graphical method for exploring heterogeneity in meta-analyses: application to a meta-analysis of 65 trials*. Stat Med., 2002; 21(18), p. 2641-2652.
- Bax L, Ikeda N, Fukui N, Yaju Y, Tsuruta H, Moons KG. *More than numbers: the power of graphs in meta-analysis*. Am J Epidemiol., 2009; 169(2), p. 249-255.
- Bax L, Yu LM, Ikeda N, Moons KG. *A systematic comparison of software dedicated to meta-analysis of causal studies*. BMC Med Res Methodol., 2007; 7(40), p. 1-9.
- Bax L, Yu LM, Ikeda N, Tsuruta H, Moons KG. *Development and validation of MIX: comprehensive free software for meta-analysis of causal research data*. BMC Med Res Methodol., 2006; 6(50), p. 1-11.

- Bax L, Yu LM, Ikeda N, Tsuruta H, Moons KG. *MIX: Comprehensive free software for meta-analysis of causal research data*. Version 1.7. Sagamihara, Japan: Kitasato Clinical Research Center. 2008.
- Beaglehole R, Bonita R, Kjellstrom T. *Basic epidemiology*. Geneva: World Health Organization. 1993.
- Begg C, Cho M, Eastwood S, Horton R, Moher D, Olkin I, Pitkin R, Rennie D, Schulz KF, Simel D, Stroup DF. *Improving the quality of reporting of randomized controlled trials: the CONSORT statement*. JAMA, 1996; 276(8), p. 637–639.
- Begg CB, Berlin JA. *Publication bias: a problem in interpreting medical data*. J R Stat Soc., 1988; 151(3), p. 419-463.
- Begg CB, Cooper H, Hedges LV. *Publication bias*. In *The Handbook of Research synthesis*. New York: Russell Sage Foundation, 1994, p. 399-409.
- Begg CB, Mazumdar M. *Operating characteristics of a rank correlation test for publication bias*. Biometrics, 1994, 50(4), p. 1088-1101.
- Belli S, Vanacore N. *Proportionate mortality of Italian soccer players: is amyotrophic lateral sclerosis an occupational disease?* Eur J Epidemiol. 2005; 20(3), p. 237-242.
- Belli S., Vanacore N. *Sports and amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurol Sci. 2008; 269 (1-2) p. 191-192.
- Bellinger D, Leviton A, Waternaux C, Needleman H, Rabinowitz M. *Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development*. N Engl J Med., 1987; 316(17), p. 1037-1043.
- Benedetti MD, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, Schaid DJ, Rocca WA. *Smoking, alcohol and coffee consumption preceding Parkinson's disease: a case-control study*. Neurology, 2000; 55(9), p. 1350-1358.
- Ben-Shlomo Y, Marmot MG. *Survival and cause of death in a cohort of patients with parkinsonism: possible clues to aetiology?* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1995; 58(3), p. 293-299.
- Ben-Shlomo Y. *The epidemiology of Parkinson's disease*. Baillieres Clin Neurol., 1997; 6(1), p. 55-68.
- Bento-Abreu A, Van Damme P, Van Den Bosch L, Robberecht W. *The neurobiology of amyotrophic lateral sclerosis*. Eur J Neurosci. 2010; 31(12), p. 2247-65.
- Beral V. *"The practice of meta-analysis": discussion. Meta-analysis of observational studies: a case study of work in progress*. J Clin Epidemiol., 1995, 48 (1), p. 165-166.
- Berg D, Gerlach M, Youdim MBH, Double KL, Zecca L, Riederer P, Becker G. *Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease*. J Neurochem., 2001; 79(2), p. 225-236.

- Berlin JA. *Does blinding of readers affect the results of meta-analyses?* University of Pennsylvania Meta-analysis Blinding Study Group. *Lancet*, 1997; 350(9072), p. 185-186.
- Bero LA, Jadad AR. *How consumers and policymakers can use systematic reviews for decision making.* *Ann Intern Med.*, 1997, 127(1), p. 37-42.
- Berry C, La Vecchia C, Nicotera P. *Paraquat and Parkinson's disease.* *Cell Death Differ.*, 2010; 17(7), p. 1115-1125.
- Betarbet R, Sherer TB, Di Monte DA, Greenamyre JT. *Mechanistic approaches to Parkinson's disease pathogenesis.* *Brain Pathol.*, 2002; 12(4), p. 499–510.
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT: *Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease.* *Nat Neurosci* 2000, 3(12), p. 1301-1306.
- Bezzi C. *Il disegno della ricerca valutativa.* Franco Angeli, Milano. 2001.
- Bezzi C. *Glossario della ricerca valutativa.* Gramma Edizioni, Perugia. 2004.
- Bharath S, Hsu M, Kaur D, Rajagolapan S, Anderson JK. *Glutathione, iron and Parkinson's disease.* *Biochem Pharmacol.*, 2002; 64(5-6), p. 1037-1048.
- Blair A, Zahm SH. *Cancer among farmers.* *Occup Med.*, 1991, 6(3), p. 335-354.
- Blettner M, Sauerbrei W, Schlehofer B, Scheuchenpflug T, Friedenreich C. *Traditional reviews, meta-analyses and pooled analyses in epidemiology.* *Int J Epidemiol.*, 1999; 28(1), p. 1-9.
- Bonifati V, Fabrizio E, Vanacore N, De Mari M, Meco G. *Familial Parkinson's disease: a clinical genetic analysis.* *Can J Neurol Sci.*, 1995; 22(4), p. 272-279.
- Bonifati V, Vanacore N, Bellatreccia A, Meco G. *Mortality rates for parkinsonism in Italy (1969 to 1987).* *Acta Neurol Scand.*, 1993; 87(1), p. 9-13.
- Bonneh-Barkay D, Langston WJ, Di Monte DA. *Toxicity of redox cycling pesticides in primary mesencephalic cultures.* *Antioxid Redox Signal.*, 2005; 7(5-6), p. 649–653.
- Bonneh-Barkay D, Reaney SH, Langston WJ, Di Monte DA. *Redox cycling of the herbicide paraquat in microglial cultures.* *Brain Res Mol Brain Res.*, 2005; 134(1), p. 52–56.
- Borenstein M, Hedges L, Higgins J, Rothstein HR. *Computing effect sizes for meta-analysis.* Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. 2009.
- Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR. *Introduction to meta-analysis.* Chichester, West Sussex (UK): John Wiley and Sons, Ltd., 2009, pp. 3-7; 117-125.
- Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR. *Comprehensive Meta-Analysis (Version 2.2.048).* Englewood, NJ: Biostat. 2008.
- Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA. *Incidence of progressive supranuclear palsy and multiple system atrophy in Olmsted County, Minnesota, 1976-1990.* *Neurology*, 1997; 49(5), p. 1284-1288.

- Braeckman L, De Bacquer D, Maes L, De Backer G. *Effects of a low-intensity worksite-based nutrition intervention*. *Occup Med.*, 1999; 49(8), p. 549-555.
- Bray TM. *Antioxidants and oxidative stress in health and disease: introduction*. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 1999; 222(3), p. 195.
- Breslow NE, Day NE. *Statistical methods in cancer research, volume 1 - the analysis of case-control studies*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 1980.
- Breslow NE, Day NE. *Statistical methods in cancer research, volume 2 - the design and analysis of cohort studies*. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 1987.
- Briggs D, Corvalán C, Nurminen M, ed. *Linkage methods for environment and health analysis, general guidelines: a report of the Health and Environment Analysis for Decision-making (HEADLAMP) project*. Geneva: World Health Organization. 1996; viii, 136 p. Ilus, tab. (WHO/EHG/95.26).
- Briss PA, Zaza S, Pappaioanou M, Fielding J, Wright-De Agüero L, Truman BI, Hopkins DP, Mullen PD, Thompson RS, Woolf SH, Carande-Kulis VG, Anderson L, Hinman AR, McQueen DV, Teutsch SM, Harris JR. *Developing an evidence-based Guide to Community Preventive Services--methods. The Task Force on Community Preventive Services*. *Am J Prev Med.*, 2000; 18(1 Suppl), p. 35-43.
- Brody JG, Vorhees DJ, Melly SJ, Swedis SR, Drivas PJ, Rudel RA. *Using GIS and historical records to reconstruct residential exposure to large-scale pesticide application*. *J Expo Anal Environ Epidemiol.*, 2002; 12(1), p. 64-80.
- Brooks AI, Chadwick CA, Gelbard HA, Cory-Slechta DA, Federoff HJ. *Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss*. *Brain Res.*, 1999; 823(1-2), p. 1-10.
- Brown RC, Lockwood AH, Sonawane BR. *Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors*. *Environ Health Perspect.* 2005;113(9). p. 1250-6.
- Brown TP, Rumsby PC, Capleton AC, Rushton L, Levy LS. *Pesticides and Parkinson's disease – is there a link?* *Environ Health Perspect* 2006; 114(2), p. 156–164.
- Brownson RC, Baker EA, Leet TL, Gillespie KN. *Evidence-based Public health*. Oxford University press. 2003.
- Brownson RC, Gurney JG, Land GH. *Evidence- based decision making in public health*. *J Public Health Manag Pract.*, 1999; 5(suppl 5), p. 86–97.
- Brownson RC, Reif JS, Chang JC, Davis JR. *Cancer risks among Missouri farmers*. *Cancer*, 1989, 64(11), p. 2381-2386.
- Brunekreef B, Noy D, Biersteker K, Boleij J. *Blood lead levels of Dutch city children and their relationship to lead in the environment*. *J Air Pollut Control Assoc.*, 1983; 33(9), p. 872-876.

- Burmeister LF, Everett GD, Van Lier SF, Isacson P. *Selected cancer mortality and farm practices in Iowa*. Am J Epidemiol., 1983; 118(1), p. 72-77.
- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ. *A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*. Proc Natl Acad Sci USA., 1983; 80(14), p. 4546-4550.
- Bushman BJ, Wells GL. *Narrative impressions of literature: The availability bias and the corrective properties of meta-analytic approaches*. Pers Soc Psychol Bull., 2001; 27(9), p. 1123-1130.
- Butterfield DA, Boyd-Kimball D. *Amyloid beta-peptide (1-42) contributes to the oxidative stress and neurodegeneration found in Alzheimer disease brain*. Brain Pathol., 2004; 14(4), p. 426-432.
- Butterfield PG, Valanis BG, Spencer PS, Lindeman CA, Nutt JG. *Environmental antecedents of young-onset Parkinson's disease*. Neurology, 1993; 43(6), p. 1150-1158.
- Caban-Holt A, Mattingly M, Cooper G, Schmitt FA. *Neurodegenerative memory disorders: a potential role of environmental toxins*. Neurol Clin., 2005; 23(2), p. 485-521.
- Calabrese V., Raffaele R., Cosentino E., Rizza V. 1994 "Changes in cerebrospinal fluid levels of malondialdehyde and glutathione reductase activity in multiple sclerosis" Int J Clin Pharmacol Res. Vol. 14: 119-123.
- Calabrese V, Sultana R, Scapagnini G, Guagliano E, Sapienza M, Bella R, Kanski J, Pennisi G, Mancuso C, Stella AM, Butterfield DA. *Nitrosative stress, cellular stress response, and thiol homeostasis in patients with Alzheimer's disease*. Antioxid Redox Signal., 2006; 8(11-12), p. 1975–1986.
- Callcut RA, Branson RD. *How to read a review paper*. Respir Care. 2009; 54(10), p. 1379-1385.
- Calne DB, Langston JW. *Aetiology of Parkinson's disease*. Lancet, 1983; 2(8365-8366), p. 1457-1459.
- Calne DB., Eisen A, McGeer E, Spencer P. *Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and motoneurone disease: abiotrophic interaction between ageing and environment?* Lancet. 1986; 2(8515), p. 1067–1070.
- Campbell A. *Inflammation, neurodegenerative diseases, and environmental exposures*. Ann N Y Acad Sci., 2004; 1035, p. 117-132.
- Canfield R.L., Henderson C.R. Jr, Cory-Slechta D.A., Cox C., Jusko T.A., Lanphear B.P., *Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter*. N Engl J Med., 2003; 348(16), p. 1517–1526.
- Cappelleri JC, Ioannidis JP, Schmid CH, De Ferranti SD, Aubert M, Chalmers TC, Lau J. *Large trials vs meta-analysis of smaller trials: how do their results compare?*. JAMA, 1996; 276(16), p. 1332-1338.
- Carande-Kulis VG, Maciosek MV, Briss PA, Teutsch SM, Zaza S, Truman BI, Messonnier ML, Pappaioanou M, Harris JR, Fielding J. *Methods for systematic*

reviews of economic evaluations for the Guide to Community Preventive Services. Task Force on Community Preventive Services. *Am J Prev Med.*, 2000; 18(suppl 1), p. 75–91.

Carbonell E, Valbuena A, Xamena N, Creus A, Marcos R. *Temporary variations in chromosomal aberrations in a group of agricultural workers exposed to pesticides.* *Mutat Res.*, 1995; 344(3-4), p. 127-134.

Casula D. *La medicina del lavoro.* Bologna, Monduzzi Ed. Terza Edizione, 2003.

Cazzato G, Capus L, Monti F, Carraro N. *Abitudine al fumo e morbo di Parkinson.* *Riv Neurol.*, 1985; 55(2), p. 79-87.

Centers for Disease Control (CDC). *Principles of epidemiology: an introduction to applied epidemiology and biostatistics, 2nd edition.* Atlanta, Georgia: Dept. Of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Centers for Disease Control. 1992.

Chalmers TC, Smith H Jr, Blackburn B, Silverman B, Schroeder B, Reitman D, Ambroz A. *A method for assessing the quality of a randomized control trial.* *Control Clin Trials.*, 1981; 2(1), p. 31-49.

Chalmers TC, Frank CS, Reitman D. *Minimizing the three stages of publication bias.* *JAMA*, 1990; 263(10), p. 1392-1395.

Chan DK, Woo J, Ho SC, Pang CP, Law LK, Ng PW, Hung WT, Kwok T, Hui E, Orr K, Leung MF, Kay R. *Genetic and environmental risk factors for Parkinson's disease in a Chinese population.* *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1998; 65(5), p. 781–784.

Chang PA, Wu YJ. *Motor neuron diseases and neurotoxic substances: a possible link?* *Chem Biol Interact.*, 2009; 180(2), p. 127-130.

Checkoway HA, Pearce NE, Crawford-Brown DJ. *Research methods in occupational epidemiology.* New York: Oxford University Press. 1989.

Chio A, Magnani C, Schiffer D. *Prevalence of Parkinson's disease in Northwestern Italy: comparison of tracer methodology and clinical ascertainment of cases.* *Mov Disord.*, 1998; 13(3), p. 400-405.

Christensen E. *Multivariate survival analysis using Cox's regression model.* *Hepatology*, 1987; 7(6), p. 1346-1358.

Clayton D, Hills M. *Statistical model in epidemiology.* Oxford University Press, New York. 1993.

Clewell HJ, Gentry PR, Covington TR, Sarangapani R, Teeguarden JG. *Evaluation of the potential impact of age - and gender - specific pharmacokinetic differences on tissue dosimetry.* *Toxicol Sci.* 2004; 79(2), p. 381–393.

Cocco P. *Retrospective exposure assessment in occupational epidemiology: principles and methods.* *G Ital Med Lav Ergon.*, 2010; 32(4 Suppl), p. 292-294.

Cohen AJ, Gordis L. *Introduction to the Health Effects Institute Environmental Planning Project documents.* *Environ Health Perspect.*, 1993; 101(suppl 4), p. 15-17.

Colosimo C, Vanacore N, Bonifati V, Fabbrini G, Rum A, De Michele G, De Mari M, Bonuccelli U, Nicholl DJ, Meco G, European Study Group on Atypical Parkinsonism (ESGAP) Consortium. *Clinical diagnosis of multiple system atrophy: level of agreement between Quinn's criteria and the consensus conference guidelines*. Acta Neurol Scand., 2001; 103(4), p. 261-264.

Concato J, Shah N, Horwitz RI. *Randomized, controlled trials, observational studies, and the hierarchy of research designs*. N Engl J Med., 2000, 342(25), p. 1887-1892.

Coniglio WA, Berger PS, Cotruvo JA. *Water pollution and chemical contamination in drinking water*. In: Tarcher AB, ed. Principles and practice of environmental medicine. New York: Plenum Medical Book Company. 1992.

Cooper H, Hedges LV, Valentine J. eds. *The handbook of research synthesis*. New York: Russell Sage Foundation, 1994.

Cornfield J. *A statistical problem arising from retrospective studies*. In *proceedings of Third Berkeley Symposium vol.4*, ed J. Neyman 135-148 Berkeley CA: University of California Press, 1956.

Corrigan FM, Wienburg CL, Shore RF, Daniel SE, Mann D. *Organochlorine insecticides in substantia nigra in Parkinson's disease*. J Toxicol Environ Health A., 2000; 59(4), p. 229-234.

Corvalan C, Kjellstrom T. *Health and environment analysis for decision making*. World Health Stat Q., 1995; 48(2), p. 71-77.

Cory-Slechta DA, Thiruchelvam M, Richfield EK, Barlow BK, Brooks AI. *Developmental pesticide exposures and the Parkinson's disease phenotype*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol., 2005; 73(3), p. 136-139.

Cory-Slechta DA, Thiruchelvam M, Barlow BK, Richfield EK. *Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype*. Environ Health Perspect., 2005; 113(9), p. 1263-1270.

Cory-Slechta DA. *Studying Toxicants as single chemicals: does this strategy adequately identify neurotoxic risk?* Neurotoxicology, 2005; 26(4), p. 491-510.

Costello S, Cockburn M, Bronstein J, Zhang X, Ritz B. *Parkinson's disease and residential exposure to maneb and paraquat from agricultural applications in the central valley of California*. Am J Epidemiol., 2009; 169(8), p. 919-926.

Cross AJ, Crow TJ, Dawson JM, Ferrier IN, Johnson JA, Peters TJ, Reynolds GP. *Subcellular pathology of human neurodegeneration disorders: Alzheimer-type dementia and Huntington's disease*. J Neurochem., 1986; 47(3), p. 882-889.

Curtin F, Altman DG, Elbourne D. *Meta-analysis combining parallel and cross-over clinical trials. I: Continuous outcomes*. Stat Med., 2002, 21(15), p. 2131-2144.

Curtin F, Elbourne D, Altman DG. *Meta-analysis combining parallel and cross-over clinical trials. II: Binary outcomes*. Stat Med., 2002, 21(15), p. 2145-2159.

Davanzo F, Travaglia A, Chiericozzi M, Dimasi V, Sesana F, Faraoni L, Settini L, Ballard TJ. *Intossicazioni da prodotti antiparassitari rilevate dal Centro*

Antiveleni di Milano nel periodo 1995-1998. Ann Ist Super Sanità, 2001; 37(2), p. 127-131.

Davies JK, Macdonald G. *Quality, Evidence and Effectiveness in Health Promotion. Striving for certainties*, Routledge, London-New York. 1998.

Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ. *Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues*. Psychiatry Res., 1979; 1(3), p. 249-254.

Dawson TM, Dawson VL. *Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease*. Science, 2003; 302(5646), p. 819-822.

De Fonzo V, Bersani E, Bluffi-Pentini F, Castrignano T, Parisi V. *Ripetizioni consecutive nel genoma umano e malattie neurodegenerative*. Poster – Neuroinformatica, Sessione III, working group ESPRIT – CNR. 2006.

De Konig H. *Setting environmental standards: guidelines for decision-making*. Geneva: World Health Organization. 1989.

De Long MR. *Primate models of movement disorders of basal ganglia origin*. Trends Neurosci., 1990; 13, p. 281-285.

De Magistris R, Toderico C, Coperto P, Zampi M, Torre S. *L'importanza del dosaggio dei nutrienti nella prevenzione e cura delle malattie cronico-degenerative dell'uomo*. Biologi Italiani, 2006; 11, p. 7-16.

De Michele G, Filla A, Volpe G, De Marco V, Gogliettino A, Ambrosio G, Marconi R, Castellano AE, Campanella G. *Environmental and genetic risk factors in Parkinson's disease: a case-control study in southern Italy*. Mov Disord., 1996; 11(1), p. 17-23.

De Palma G, Mozzoni P, Mutti A, Calzetti S, Negrotti A. *Case-control study of interactions between genetic and environmental factors in Parkinson's disease*. Lancet, 1998; 352(9145), p. 1986-1987.

de Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, Ott A, Grobbee DE, van der Meche FG, Hofman A. *Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam study*. Neurology, 1995; 45(12), p. 2143-2146.

de Rijk MC, Rocca WA, Anderson DW, Melcon MO, Breteler MMB, Maraganore DM. *A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease*. Neurology, 1997; 48(5), p. 1277-1281.

Dear K, Begg C. *An approach for assessing publication bias prior to performing a meta-analysis*. Stat Science, 1992; 7, p. 237-245.

DerSimonian R, Laird N. *Meta-analysis in clinical trials*. Control Clin Trials, 1986; 7(3), p. 177-188.

Dexter DT, Carter CJ, Wells FR, Lees AJ, Agid F, Agid Y, Jenner P, Marsden CD. *Basal lipid peroxidation in substantia nigra increased in Parkinson's disease*. J Neurochem, 1989; 52(2), p. 381-389.

Di Monte DA. *The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins?* Lancet Neurol., 2003; 2(9), p. 531-538.

- Di Monte DA, Lavasani M, Manning-Bog AB. *Environmental factors in Parkinson's disease*. Neurotoxicology, 2002; 23(4-5), p. 487–502.
- Di Monte DA, Sandy MS, Ekstrom G, Smith MT. *Comparative-studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cytotoxicity*. Biochem Biophys Res Commun., 1986; 137, p. 303–309.
- Diamond SG, Markham CH. *Present mortality in Parkinson's disease: the ratio of observed to expected deaths with a method to calculate expected deaths*. J Neural Transm., 1976; 38(3-4), p. 259-269.
- Dich J, Zahm SH, Hanberg A, Adami HO. *Pesticides and cancer*. Cancer Causes Control. 1997; 8(3), p. 420-443.
- Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, Scott NW, Prescott GJ, Bennett J, Semple S, Dick S, Counsell C, Mozzoni P, Haites N, Wettinger SB, Mutti A, Otelea M, Seaton A, Söderkvist P, Felice A; Geoparkinson study group. *Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study*. Occup Environ Med. 2007; 64(10), p. 666-672.
- Dick FD. *Parkinson's disease and pesticide exposures*. Br Med Bull., 2006; 79-80, p. 219-231.
- Dick S, Semple S, Dick F, Seaton A. *Occupational titles as risk factors for Parkinson's disease*. Occup Med., 2007; 57(1), p. 50-56.
- Dickersin K, Berlin JA. *Meta-analysis: state-of-the-science*. Epidemiol Rev., 1992; 14, p. 154-176.
- Dickersin K, Min YI, Meinert CL. *Factors influencing publication of research results: follow-up of applications submitted to two institutional review boards*. JAMA, 1992; 267(3), p. 374-378.
- Dickersin K. *The existence of publication bias and risk factors for its occurrence*. JAMA, 1990; 263(10), p. 1385-1389.
- Dickersin K. *Publication bias: Recognizing the problem, understanding its origins and scope, and preventing harm*. In: Rothstein HR, Sutton AJ, Borenstein M. (Eds.), Publication bias in meta-analysis (pp. 127-144). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. 2005.
- Dinis-Oliveira RJ, Remia F, Carmo H, Duarte JA, Sanchez Navarro A, Bastos ML, Carvalho F. *Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease*. Neurotoxicology. 2006; 27(6), p. 1110–1122.
- Donham KJ, Rautiainen RH, Lange JL, Schneiders S. *Injury and illness costs in the certified safe farm study*. J Rural Health, 2007; 23(4), p. 348-355.
- Dorsch MM, Scragg RK, McMichael AJ, Baghurst PA, Dyer KF. *Congenital malformations and maternal drinking water supply in rural South Australia: a case-control study*. Am J Epidemiol., 1984; 119(4), p. 473-486.
- Drechsel DA, Patel M. *Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease*. Free Radic Biol Med., 2008; 44(11), p. 1873-1886.

- Dunn AL. *Translating evidence-based physical activity interventions into practice. The 2010 challenge.* Am J Prev Med., 2002; 22(4 Suppl), p 8-9.
- Durlach J, Bac P, Durlach V, Durlach A, Bara M, Guet-Bara A. *Are age-related neurodegenerative diseases linked with various types of magnesium depletion?* Magnes Res., 1997; 10(4), p. 339-353.
- Easterbrook PJ, Berlin JA, Gopalan R, Matthews DR. *Publication bias in clinical research.* Lancet, 1991; 337(8746), p. 867-872.
- Eaton DL, Farin F, Omiecinski CJ, Omenn GS. *Genetic susceptibility.* In: Environmental and Occupational Medicine, 3rd ed (Rom WN, ed). Philadelphia, PA:Lippincott-Raven, 1998; p. 209-221.
- Ecobichon DJ, Joy RM. *Pesticides and Neurological Diseases.* ed. Boca Raton, FL: CRC Press. 1982.
- Edwards RH. *Neural degeneration and the transport of neurotransmitters.* Ann Neurol., 1993; 34(5), p. 638–645.
- Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. *Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test.* BMJ, 1997; 315(7109), p. 629–634.
- Egger M, Zellweger-Zahner T, Schneider M, Junker C, Lengeler C, Antes G. *Language bias in randomised controlled trials published in English and German.* Lancet, 1997; 350(9074), p. 326-329.
- Elbaz A, Clavel J, Rathouz PJ, Moisan F, Galanaud JP, Delemotte B, Alperovitch A, Tzourio C. *Professional exposure to pesticides and Parkinson disease.* Ann Neurol., 2009; 66(4), p. 494–504.
- Elbaz A, Dufouil C, Alperovitch A. *Interaction between genes and environment in neurodegenerative diseases.* C R Biol., 2007; 330(4), p. 318-328.
- Elbaz A, Grigoletto F, Baldereschi M, Breteler MM, Manubens-Bertran JM, Lopez-Pousa S, Dartigues JF, Alperovitch A, Tzourio C, Rocca WA. *Familial aggregation of Parkinson's disease. A population-based case-control study in Europe. EUROPARKINSON Study Group.* Neurology, 1999; 52(9), p. 1876-1882.
- Elbaz A, Levecque C, Clavel J, Vidal JS, Richard F, Amouyel P, Alperovitch A, Chartier-Harlin MC, Tzourio C. *CYP2D6 polymorphism, pesticide exposure, and Parkinson's disease.* Ann Neurol., 2004; 55(3), p. 430-434.
- Elbaz A, Tranchant C. *Epidemiologic studies of environmental exposures in Parkinson's disease.* J Neurol Sci., 2007; 262(1-2), p. 37–44.
- El-Fawal HA, Waterman SJ, De Feo A, Shamy MY. *Neuroimmunotoxicology: humoral assessment of neurotoxicity and autoimmune mechanisms.* Environ Health Perspect, 1999; 107(5 Suppl), p. 767-775.
- Elshaug AG, Hiller JE, Moss JR. *Exploring policy-makers' perspectives on disinvestment from ineffective healthcare practices.* Int J Technol Assess Health Care. 2008; 24(1), p. 1-9.
- Engel LS, Checkoway H, Keifer MC, Seixas NS, Longstreth Jr WT, Scott KC, Hudnell K, Anger WK, Camicioli R. *Parkinsonism and occupational exposure to pesticides.* Occup Environ Med., 2001; 58(9), p. 582–589.

- Eriksson M, Lindström B. *A salutogenic interpretation of the Ottawa Charter*. Health Promot Int., 2008; 23(2), p. 190-199.
- Evidence-based Medicine Working group. *Evidence-based medicine. A new approach to teaching the practice of medicine*. JAMA, 1992; 268(17), p. 2420-2425.
- Factor SA, Weiner WJ. *Prior history of head trauma in Parkinson's disease*. Mov Disord., 1991; 6(3), p. 225-229.
- Fahn S, Elton RL. *Unified Parkinson's disease rating scale*. In: Fahn S, Marsden CD, Calne D, Goldstein M (Ed.). *Recent developments in Parkinson's disease*. Florham Park, NJ: MacMillan Healthcare Information, 1987, p. 153-63; 293-304.
- Fall PA, Fredrikson M, Axelson O, Granerus AK. *Nutritional and occupational factors influencing the risk of Parkinson's disease: a case-control study in southeastern Sweden*. Mov Disord., 1999; 14(1), p. 28-37.
- Fatighenti P, Lombardi A, Conti V, Baggiani A, Barale A, Mattei R, Giacchi M, Pagani R, Marinello E, Zuccherelli D. *La promozione della salute e i servizi di Igiene degli alimenti e della Nutrizione (SIAN)*. Rivista Italiana di Igiene, 2001.
- Feinstein AR. *Para-analysis, faute de mieux, and the perils of riding on a data barge*. J Clin Epidemiol., 1989; 42(10), p. 929-935.
- Ferri GM, Lopopolo M, Speranza G, Di Pasquale N. *Exposure to pesticides and non-Hodgkin lymphoma. A meta-analysis of observational studies*. G Ital Med Lav Ergon., 2007, 29 (3 Suppl), p. 617-619.
- Ferri M. *Le revisioni sistematiche*. Care, 2004; 2, p. 23-25.
- Figa-Talamanca I, Mearelli I, Valente P, Bascherini S. *Cancer mortality in a cohort of rural licensed pesticide users in the province of Rome*. Int J Epidemiol., 1993, 22 (4), p. 579-83.
- Finocchiaro G, Gitto G, Caruso R. *Metodi Statistici per la valutazione del rischio: il metodo di Mantel-Haenszel*. Acta Medica Mediterranea, 2007, 23, p. 141-145.
- Firestone JA, Lundin JJ, Powers KM, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Longstreth WT, Jr., Checkoway H. *Occupational factors and risk of Parkinson's disease: A population-based case-control study*. Am J Ind Med., 2010; 53(3), p. 217-223.
- Firestone JA, Smith-Weller T, Franklin G, Swanson P, Longstreth WT Jr, Checkoway H. *Pesticides and risk of Parkinson disease: a population-based case-control study*. Arch Neurol., 2005; 62(1), p. 91-95.
- Fischbein A. *Occupational and environmental exposure to lead*. In: Rom W, ed. *Environmental and occupational medicine*, 3rd edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1998, p. 973-996.
- Fischhoff B, Bostrom A, Quadrel MJ. *Risk perception and communication*. Annu Rev Public Health., 1993; 14, p. 183-203.
- Fisher RA. *Statistical Methods for Research Workers*. 4th ed. Oliver and Boyd, Edinburgh. 1932.

- Flaten TP. *Geographical associations between aluminium in drinking water and death rates with dementia, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis in Norway*. Trace Elem Med., 1987; 4, p. 179–180.
- Fleiss JL, Gross AJ. *Meta-analysis in epidemiology, with special reference to studies of the association between exposure to environmental tobacco smoke and lung cancer: a critique*. J Clin Epidemiol., 1991; 44(2), p. 127-139.
- Fleming L, Mann JB, Bean J, Briggle T, Sanchez-Ramos JR. *Parkinson's disease and brain levels of organochlorine pesticides*. Ann Neurol., 1994; 36(1), p. 100-103.
- Flournoy N, Olkin I. *Do small trials square with large ones?* Lancet, 1995; 345(8952), p. 741-742.
- Forastiere F, Quercia A, Miceli M, Settini L, Terenzoni B, Rapiti E, Faustini A, Borgia P, Cavariani F, Perucci CA. *Cancer among farmers in central Italy*. Scand J Work Environ Health, 1993; 19(6), p. 382-389.
- Forsberg L, de Faire U, Morgenstern R. *Oxidative stress, human genetic variation and disease*. Arch. Biochem Biophys., 2001; 389(1), p. 84-93.
- Foster HD. *Why the preeminent risk factor in sporadic Alzheimer's disease cannot be genetic*. Med Hypotheses, 2002; 59(1), p. 57-61.
- Franceschi S, Barbone F, Bidoli E, Guarneri S, Serraino D, Talamini R, La Vecchia C. *Cancer risk in farmers: results from a multi-site case-control study in north-eastern Italy*. Int J Cancer, 1993; 53(5), p. 740-745.
- Fraser DW. *Epidemiology as a liberal art*. N Engl J Med., 1987; 316(6), p. 309-314.
- Frigerio R, Sanft KR, Grossardt BR, Peterson BJ, Elbaz A, Bower JH, Ahlskog JE, de AM, Maraganore DM, Rocca WA. *Chemical exposures and Parkinson's disease: a population-based case-control study*. Mov Disord., 2006; 21(10), p. 1688–1692.
- Gadomski A, Ackerman S, Burtik P, Jenkins P. *Efficacy of the north American guidelines for children's agricultural task in reducing childhood agricultural injuries*. Am J Public Health., 2006; 96(4), p. 722-727.
- Gait R, Maginnis C, Lewis S, Pickering N, Antoniak M, Hubbard R, Lawson I, Britton J. *Occupational exposure to metals and solvents and the risk of motor neuron disease. A case-control study*. Neuroepidemiology, 2003; 22(6), p. 353–356.
- Galbraith RF. *A note on graphical presentation of estimated odds ratios from several clinical trials*. Stat Med., 1988; 7(8), p. 889–894.
- Gao HM, Hong JS, Zhang W, Liu B. *Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease*. J Neurosci., 2003; 23(4), p. 1228–1236.
- Gao HM, Jiang J, Wilson B, Zhang W, Hong JS, Liu B. *Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic*

neurons: relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem.*, 2002; 81(6), p. 1285-1297.

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(4), p. 249-255.

Gardner MJ, Altman DG. *Confidence intervals rather than P values: estimation rather than hypothesis testing.* *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1986; 292(6522), p. 746-750.

Gasser T. *Genetics of Parkinson's disease.* *J Neurol.*, 2001; 248(10), p. 833-840.

Gatto NM, Cockburn M, Bronstein J, Manthripragada AD, Ritz B. *Well-water consumption and Parkinson's disease in rural California.* *Environ Health Perspect.*, 2009; 117(12), p. 1912-1918.

Gehlbach SH, Farrow SC, Fowkes FG, West RR, Roberts CJ. *Epidemiology for medical students: a controlled trial of three teaching methods.* *Int J Epidemiol.*, 1985; 14(1), p. 178-181.

Geller AM, Zenick H. *Aging and the environment: a research framework.* *Environ Health Perspect.*, 2005; 113(9), p. 1257-1262.

Gerlach M, Ben-Schacar D, Rieder P, Youdim MBH. *Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative disease?* *J Neurochem.*, 1994; 63(3), p. 793-807.

Gerlach M, Double KL, Youdim MBH, Riederer P. *Strategies for the protection dopaminergic neurons against neurotoxicity.* *Neurotox Res.*, 2000; 2(2-3), p. 99-114.

Gibb WR, Lees AJ. *The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease.* *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1988; 51(6), p. 745-752.

Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. *The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: the need for effective antioxidant therapy.* *J Neurol.*, 2004; 251(3), p. 261-268.

Gilman S, Low P, Quinn N, Albanese A, Ben-Shlomo Y, Fowler CJ, Kaufmann H, Klockgether T, Lang AE, Lantos PL, Litvan I, Mathias CJ, Oliver E, Robertson D, Schatz I, Wenning GK. *Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy.* *J Neurol Sci.*, 1999; 163(1), p. 94-98.

Glass GV. *Primary, secondary, and meta-analysis of reasearch.* Educational researcher. 1976; p. 3-8.

Glass GV. *Integrating findings: The meta-analysis of research.* Review of Research in Education, 1978; 5, p. 351-379.

Gliner JA, Morgan GA, Harmon RJ. *Meta-analysis: formulation and interpretation.* *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 2003; 42(11), p. 1376-1379.

Gobba F. *Occupational exposure to chemicals and sensory organs: a neglected research field.* *Neurotoxicology*, 2003; 24(4-5), p. 675-691.

- Godwin-Austen RB, Lee PN, Marmot MG, Stern GM. *Smoking and Parkinson's disease*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1982; 45(7), p. 577-581.
- Golbe LI, Farrell TM, Davis PH. *Follow-up study of early-life protective and risk factors in Parkinson's disease*. Mov Disord., 1990; 5(1), p. 66-70.
- Gold M, Siegel JE, Russell LB, Weinstein MC, eds. *Cost-effectiveness in health and medicine*. New York: Oxford University Press, 1996: Appendix, A304–311.
- Gold MR, Franks P, McCoy KI, Fryback DG. *Toward consistency in cost-utility analyses: using national measures to create condition-specific values*. Med Care, 1998; 36(6), p. 778–792.
- Goldman L, Feinstein AR. *Anticoagulants and myocardial infarction. The problems of pooling, drowning and floating*. Ann Intern Med., 1979; 90(1), p. 92-94.
- Goldman SM, Tanner CM, Olanow CW, Watts RL, Field RD, Langston JW. *Occupation and parkinsonism in three movement disorders clinics*. Neurology, 2005; 65(9), p. 1430-1435.
- Goldsmith JR. *Environmental epidemiology: epidemiological investigation of community environmental health problems*. Boca Raton, Florida: CRC Press. 1988.
- Gonnella L. *La misurazione e la valutazione del rischio*. In: Gilli G (ed) *Igiene dell'ambiente e del territorio*. Demografia, Prevenzione e Sanità pubblica. GC Ed. Medico Scientifiche, Torino. 1989.
- Gorell JM, Jhonson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ. *The risk of Parkinson's disease with exposure to the pesticides, farming, well water and rural living*. Neurology, 1998; 50(5), p. 1346-1350.
- Gorell JM, Peterson EL, Rybicki BA, Johnson CC. *Multiple risk factors for Parkinson's disease*. J Neurol Sci., 2004; 217(2), p. 169-174.
- Gorell JM, Rybicki BA, Johnson CC, Peterson EL. *Smoking and Parkinson's disease: a dose-response relationship*. Neurology, 1999; 52(1), p. 115-119.
- Gould MR, Siegel JE, Russell LB, Weinstein MC, eds. *Cost – effectiveness in health and medicine*. Oxford: Oxford University Press. 1996.
- Gowers WR. *A manual of disease of the nervous system*. Philadelphia: Blackiston. 1888.
- Graham JD, Corso PS, Morris JM, Segui-Gomez M, Weinstein MC. *Evaluating the cost-effectiveness of clinical and public health measures*. Ann Rev Public Health, 1998; 19, p. 125–152.
- Graham JM, Sagar HJ. *A data-driven approach to the study of heterogeneity in idiopathic Parkinson's disease: identification of three distinct subtypes*. Mov Disord., 1999; 14(1), p. 10-20.
- Grandinetti A, Morens DM, Reed D, MacEachern D. *Prospective study of cigarette smoking and the risk of developing idiopathic Parkinson's disease*. Am J Epidemiol., 1994; 139(12), p. 1129-1138.

- Grandjean P, Landrigan PJ. *Developmental neurotoxicity of industrial chemicals*, The Lancet, 2006, 368(9553), p. 2167-2178.
- Granieri E. *Epidemiologia del Morbo di Parkinson*. In: Manuale di Neuroepidemiologia Clinica, E Granieri e G Rosati (eds), la Nuova Italia Scientifica, Roma. 1990, p. 183-209.
- Grayson HA, Guyer B. *Public MCH program functions framework: essential public health services to promote maternal and child health in America*. Baltimore, MD: Child and Adolescent Health Policy Center at Johns Hopkins University. 1995.
- Green LW, Kreuter MW. *Health promotion planning: An educational and ecological approach*. Mountain View, Mayfield Publishing. 1999.
- Greenland S. *Limitations of the logistic analysis of epidemiologic data*. Am J Epidemiol., 1979; 110(6), p. 693-698.
- Greenland S, Robins JM. *Confounding and misclassification*. Am J Epidemiol., 1985; 122(3), p. 495-506.
- Greenland S, Robins JM. *Identifiability, exchangeability, and epidemiological confounding*. Int J Epidemiol., 1986; 15(3), p. 413-419.
- Greenland S, Salvan A. *Bias in the one-step method for pooling study results*. Stat Med., 1990; 9(3), p. 247-252.
- Greenland S. *Interpretation and choice of effect measures in epidemiologic analyses*. Am J Epidemiol., 1987; 125(5), p. 761-768.
- Greenland S. *Invited commentary: a critical look at some popular meta-analytic methods*. Am J Epidemiol., 1994; 140(3), p. 290-296.
- Greenland S. *Quantitative methods in the review of epidemiologic literature*. Epidemiol Rev., 1987; 9, p. 1-30.
- Greenwald AG. *Consequences of prejudice against the null hypothesis*. Psychol Bull., 1975; 82, p. 1-20.
- Gun RT, Korten AE, Jorm AF, Henderson AS, Broe GA, Creasey H, McCusker E, Mylvaganam A. *Occupational risk factors for Alzheimer disease: a case-control study*. Alzheimer Dis Assoc Disord., 1997; 11(1), p. 21-27.
- Gurunathan S, Robson M, Freeman N, Buckley B, Roy A, Meyer R, Bukowski J, Lioy PJ. *Accumulation of chlorpyrifos on residential surfaces and toys accessible to children*. Environ Health Perspect., 1998; 106(1), p. 9-16.
- Gyorkos TW, Tannenbaum TN, Abrahamowicz M, Oxman AD, Scott EA, Millson ME, Rasooly I, Frank JW, Riben PD, Mathias RG, et al. *An approach to the development of practice guidelines for community health interventions*. Can J Public Health, 1994; 85(suppl 1), p. S8-S13.
- Haddix AC, Teutsch SM, Shaffer PA, Dunet DO. *Decision analysis and economic evaluation*. Oxford: Oxford University Press. 1996.
- Halliwell B, Gutteridge J. *Oxygen radicals and the nervous system*. Trends Neurosci., 1985; 8, p. 22-29.

- Halliwell B, Cross CE. *Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress*. Environ Health Perspect., 1994; 102(10 Suppl), p. 5-12.
- Hancock DB, Martin ER, Mayhew GM, Stajich JM, Jewett R, Stacy MA, Scott BL, Vance JM, Scott WK. *Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study*. BMC Neurol., 2008; 8(6), p. 1-12.
- Hancock DB, Martin ER, Stajich JM, Jewett R, Stacy MA, Scott BL, Vance JM, Scott WK. *Smoking, caffeine, and non-steroidal anti-inflammatory drugs in families with Parkinson disease*. Arch Neurol., 2007; 64(4), p. 576-580.
- Hancock T. *The evolution, impact and significance of the healthy cities/healthy communities movement*. J Public Health Policy, 1993; 14(1), p. 5-18.
- Hanley JA, Negassa A, Edwardes MD, Forrester JE. *Statistical analysis of correlated data using generalized estimating equations: an orientation*. Am J Epidemiol., 2003; 157(4), p. 364-375.
- Harari R, Forastiere F, Axelson O. *Unacceptable "occupational" exposure to toxic agents among children in Ecuador*. Am J Ind Med., 1997; 32(3), p. 185-189.
- Harbord RM, Egger M, Sterne JA. *A modified test for small study effects in meta-analyses of controlled trials with binary endpoints*. Stat Med., 2006; 25(20), p. 3443-3457.
- Hardy J, Cookson MRR, Singleton A. *Genes and parkinsonism*. Lancet Neurol., 2003; 2(4), p. 221-228.
- Harrel JA, Baker EL. *The essential services of public health*. Leadership in Public Health, 1994; 3(3), p. 27-30. Am J Prev Med 2000; 18(1S) 33.
- Hart J. *What evidence do we need for evidence-based medicine*", J Epidemiol Community Health, 1997; 51, p. 623-629.
- Hassal KA. *The Chemistry of Pesticides. Their metabolism, mode of action and uses in crop protection*. Weinheim, 1982.
- Hatch M, Thomas D. *Measurement issues in environmental epidemiology*. Environ Health Perspect., 1993; 101(4 Suppl), p. 49-57.
- Health CW. *Pesticides and cancer risk*. Cancer, 1997; 15, 80(10), p. 1887-1888.
- Hedges LV, Olkin I. *Statistical methods for meta-analysis*. San Diego, CA: Academic Press. 1985.
- Hedges LV, Pigott TD. *The power of statistical tests in meta-analysis*. Psychol Methods, 2001; 6(3), p. 203-217.
- Hedges LV, Pigott TD. *The power of statistical tests for moderators in meta-analysis*. Psychol Methods, 2004; 9(4), p. 426-445.
- Hedges LV, Vevea JL. *Fixed - and random - effects models in meta-analysis*. Psychol Methods, 1998; 3, p. 486-504.
- Heikkila RE, Sonsalla PK. *The use of the MPTP-treated mouse as an animal model of parkinsonism*. Can J Neurol Sci., 1987; 14(3), p. 436-440.

Hellenbrand W, Seidler A, Boeing H, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Schneider E, Ulm G. *Diet and Parkinson's disease. I: a possible role of the past intake of specific foods and food groups. Results from a self-administered food-frequency questionnaire in a case control study.* Neurology, 1996; 47(3), p. 636-643.

Hellenbrand W, Seidler A, Boeing H, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Schneider E, Ulm G. *Diet and Parkinson's disease. II: a possible role of the past intake of specific foods and food groups. Results from a self-administered food-frequency questionnaire in a case control study.* Neurology, 1996; 47(3), p. 644-650.

Hellenbrand W, Seidler A, Robra BP, Vieregge P, Oertel WH, Joerg J, Nischan P, Schneider E, Ulm G. *Smoking and Parkinson's disease: a case-control study in Germany.* Int J Epidemiol., 1997; 26(2), p. 328-339.

Helmer C, Letenneur L, Rouch I, Richard-Harston S, Barberger-Gateau P, Fabrigoule C, Orgogozo JM, Dartigues JF. *Occupation during life and risk of dementia in French elderly community residents.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2001; 71(3), p. 303-309.

Hemmerg S. *Introduction to occupational epidemiology.* Chelsea, Michigan: Lewis Publishers. 1992.

Hennessy M. Evaluation. In: Stroup DF, Teutsch SM, eds. *Statistics and public health: quantitative approaches to public health problems.* New York: Oxford University Press. 1998, p. 193-219.

Hepworth J. *Debate. Evaluation in health outcomes research: linking theories, methodologies and practice in health promotion.* Health Promotion Intern., 1997; 12, p. 233-238.

Hernán MA, Takkouche B, Caamaño-Isorna F, Gestal-Otero JJ. *A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease.* Ann Neurol., 2002; 52(3), p. 276-284.

Hertzman C, Wiens M, Bowering D, Snow B, Calne DB. *Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors.* Am J Ind Med., 1990; 17(3), p. 349-355.

Hertzman C, Wiens M, Snow B, Kelly S, Calne D. *A case-control study of Parkinson's disease in a horticultural region of British Columbia.* Mov Disord., 1994; 9(1), p. 69-75.

Hetherington J, Dickersin K, Chalmers I, Meinert CL. *Retrospective and prospective identification of unpublished controlled trials: lessons from a survey of obstetricians and pediatricians.* Pediatrics, 1989; 84(2), p. 374-380.

Higgins JP, Thompson SG, Deeks JJ, Altman DG. *Measuring inconsistency in meta-analyses.* BMJ, 2003; 327(7414), p. 557-560.

Higgins JP, Thompson SG. *Quantifying heterogeneity in a meta-analysis.* Stat Med., 2002; 21(11), p. 1539-1558.

Higgins JPT, Green S. (Eds.). *Cochrane handbook for systematic reviews of interventions.* Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. 2008.

- Hill AB. *The environment and disease: association or causation?* Proc R Soc Med., 1965; 58, p. 295-300.
- Hirano A, Nakano I, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW, Saccomanno G. *Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis.* J Neuropathol Exp Neurol., 1984; 43(5), p. 471-480.
- Hisahara S, Shimohama S. *Toxin-induced and genetic animal models of Parkinson's disease.* Parkinsons Dis., 2010; 2011(951709), p. 1-14.
- Hodgson E, Levi PE. *Pesticides: an important but under used model for the environmental health sciences.* Environ Health Perspect., 1996; 104(1 Suppl), p. 97-106.
- Hoehn MM. *Parkinson's disease: progression and mortality.* Adv Neurol., 1987; 45, p. 457-461.
- Hoehn MM, Yahr MD. *Parkinsonism: onset, progression and mortality.* Neurology, 1967; 17(5), p. 427-442.
- Hubble JP, Cao T, Hassanein RE, Neuberger JS, Koller WC. *Risk factors for Parkinson's Disease.* Neurology, 1993; 43(9), p. 1693-1697.
- Hubble JP, Cao T, Kjelstrom JA, Koller WC, Beaman BL. *Nocardia species as an etiologic agent in Parkinson's disease: serological testing in a case-control study.* J Clin Microbiol., 1995; 33(10), p. 2768-2769.
- Huedo-Medina TB, Sánchez-Meca J, Marin-Martinez F, Botella J. *Assessing heterogeneity in meta-analysis: Q statistic or I² index?* Psychol Methods, 2006; 11(2), p. 193–206.
- Hulka BS, Wilcosky TC, Griffith JD. *Biological markers in epidemiology.* New York: Oxford University Press. 1990.
- Hunter JE, Schmidt FL. *Methods of meta-analysis: correcting error and bias in research findings.* Newbury Park, CA: Sage Publications. 1990.
- Hunter JE, Schmidt FL. *Methods of meta-analysis: correcting error and bias in research findings (2nd ed.).* Newbury Park, CA: Sage Publications. 2004.
- Huston P. *Cochrane Collaboration helping unravel tangled web woven by international research.* CMAJ, 1996; 154(9), p. 1389-1392.
- Hwang SJ, Beaty TH, Liang KY, Coresh J, Khoury MJ. *Minimum sample size estimation to detect gene-environment interaction in case-control designs.* Am J Epidemiol., 1994; 140(11), p. 1029-1037.
- Iannotta C. *Revisione dei protocolli per la valutazione cognitiva-comportamentale nella sclerosi multipla.* Dipartimento di Psicologia, Università degli Studi di Torino. 1999.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.; International Agency for Research on Cancer. *Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42.* IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum Suppl, 1987; 7, p. 1-440.

International Programme Chemical Safety (IPCS). *Environmental health criteria, no.27. Guidelines on studies in environmental epidemiology*. Geneva: World Health Organization. 1983.

International Programme Chemical Safety (IPCS). *Principles for the assessment of risk from exposure to chemicals*. Geneva: World Health Organization. 1994.

Ioannidis JP, Lau J. *Pooling research results: benefits and limitations of meta-analysis*. *Jt Comm J Qual Improv.*, 1999; 25(9), p. 462-469.

Ioannidis JP, Trikalinos TA, Khoury MJ. *Implications of small effect sizes of individual genetic variants on the design and interpretation of genetic association studies of complex diseases*. *Am J Epidemiol.*, 2006; 164(7), p. 609–614.

Janson AM, Fuxe K, Goldstein M. *Differential effects of acute and chronic nicotine treatment on MTPT (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons in the black mouse*. *Clin Investig.*, 1992; 70(3-4), p. 232-238.

Javitch JA, D'Amato RJ, Strittmatter SM, Snyder SH. *Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82(7), p. 2173–2177.

Jefferson T, Zarra L. *Bufale spotting, Part 10: Assessing a journal*. *J R Soc Med.*, 2008; 101(5), p. 235-236.

Jefferson T, Zarra L. *Bufale spotting, part two: assessing systematic reviews*. *J R Soc Med.*, 2007; 100(4), p. 180-181.

Jellinger KA. *Recent advances in our understanding of neurodegeneration*. *J Neural Transm.*, 2009; 116(9), p. 1111-1162.

Jensen GE, Clausen J. *Glutathione peroxidase and reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase and catalase activity in multiple sclerosis*. *J Neurol Sci.*, 1997; 63(1), p. 45-53.

Jiménez-Jiménez FJ, Mateo D, Gimenez-Roldan S. *Exposure to well water and pesticides in Parkinson's disease: a case control study in the Madrid area*. *Mov Disord.*, 1992; 7(2), p. 149-152.

Johnson CC, Gorell JM, Rybicki BA, Sanders K, Peterson EL. *Adult nutrient intake as a risk factor for Parkinson's disease*. *Int J Epidemiol*, 1999; 28(6), p. 1102-1109.

Jones DR. *Meta-analysis of observational epidemiological studies: a review*. *J R Soc Med.*, 1992; 85(3), p. 165-168.

Kafadar K, Andrews JS. *Investigating health effects and hazards in the community*. In: Stroup DF, Teutsch SM, eds. *Statistics and public health: quantitative approaches to public health problems*. New York: Oxford University Press. 1998, p. 93–122.

Kahan B, Goodstadt M. *The interactive domain model of best practices in health promotion: developing and implementing a best practices approach to health promotion*. *Health Promot Pract.*, 2001; 2(1), p. 43-67.

- Kahn HA, Sempos CT. *Statistical methods in epidemiology*. New York: Oxford University Press. 1989.
- Kamel F, Hoppin JA. *Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease*. *Environ Health Perspect.*, 2004; 112(9), p. 950-958.
- Kamel F, Tanner C, Umbach D, Hoppin J, Alavanja M, Blair A, Comyns K, Goldman S, Korell M, Langston J, Ross G, Sandler D. *Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the agricultural health study*. *Am J Epidemiol.*, 2007; 165(4), p. 364-374.
- Kanavos P, Mossialos E. *International comparisons of health care expenditures: what we do know and what we do not know*. *J Health Serv Res Policy*, 1999; 4(2), p. 122–126.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. *Principi di Neuroscienze*. Milano, Casa Editrice Ambrosiana. 1994.
- Kang GA, Bronstein JM, Masterman DL, Redelings M, Crum JA, Ritz B. *Clinical characteristics in early Parkinson's disease in a central California population-based study*. *Mov Disord.*, 2005; 20(9), p. 1133–1142.
- Kassirer JP, Angell M. *The Journal's policy on cost - effectiveness analyses*. *N Engl J Med.*, 1994; 331(10), p. 669–670.
- Kawahara J, Horikoshi R, Yamaguchi T, Kumagai K, Yanagisawa Y. *Air pollution and young children's inhalation exposure to organophosphorus pesticide in an agricultural community in Japan*. *Environ Int.*, 2005; 31(8), p. 1123–1132.
- Kelsey JL, Whittemore AS, Evans AS, Thompson WD. *Methods in observational epidemiology, 2nd edition*. New York: Oxford University Press. 1996.
- Kessler II, Diamond EL. *Epidemiologic studies of Parkinson's disease, I. Smoking and Parkinson's disease: a survey and explanatory hypothesis*. *Am J Epidemiol.*, 1971; 94(1), p. 16-25.
- Kevekordes S, Gebel T, Pav K, Edenharder R, Dunkelberg H. *Genotoxicity of selected pesticides in the mouse bone-marrow micronucleus test and in the sister-chromatid exchange test with human lymphocytes in vitro*. *Toxicol Lett.*, 1996; 89(1), p. 35-42.
- Khoury M, Yang Q. *The future of genetic studies of complex human diseases: an epidemiologic perspective*. *Epidemiology*, 1998; 9(3), p. 350-354.
- Khoury MJ, Beaty TH, Cohen BH. *Fundamentals of genetic epidemiology*. New York: Oxford University Press. 1994.
- Kirkey KL, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Kortsha GX, Gorell JM. *Occupational categories at risk for Parkinson's disease*. *Am J Ind Med.*, 2001; 39(6), p. 564-571.
- Kjellstrom T, Corvalan C. *Framework for the development of environmental health indicators*. *World Health Stat Q.*, 1995; 48(2), p. 144-154.

- Kleinbaum DG, Kupper LL, Morgenstem H. *Epidemiologic research principles and quantitative methods*. Belmont, California: Lifetime Learning Publications. 1982.
- Kleinbaum DG, Kupper LL, Muller KE. *Applied regression analysis and other multivariable methods*. Boston: PWS-Kent Publishing Company. 1988.
- Knight RA, Verkhatsky A. *Neurodegenerative diseases: failures in brain connectivity?* Cell Death Differ., 2010; 17(7), p. 1069-1070.
- Kofman O, Berger A, Massarwa A, Friedman A, Jaffar AA. *Motor inhibition and learning impairments in school-aged children following exposure to organophosphate pesticides in infancy*. Pediatr Res., 2006; 60(1), p. 88-92.
- Kohatsu ND, Robinson JG, Torner JC. *Evidence-based public health: an evolving concept*. Am J Prev Med., 2004; 27(5), p. 417-421.
- Kohbata S, Beaman BL. *L-dopa-responsive movement disorder caused by Nocardia asteroides localized in the brains of mice*. Infect Immun., 1991; 59(1), p. 181-191.
- Koller W, Vetere-Overfield B, Gray C, Alexander C, Chin T, Dolezal J, Hassanein R, Tanner C. *Environmental risk factors in Parkinson's disease*. Neurology, 1990; 40(8), p. 1218-1221.
- Koller WC, Hubble JP. *Classification of parkinsonism*. In: Handbook of Parkinson's disease, WC Koller (ed), Marcel Dekker, Inc. New York. 1992; p. 59-102.
- Kourakis A, Mouratidou M, Kokkinos G, Barbouti A, Kotsis A, Mourelatos D, Dozi-Vassiliades J. *Frequencies of chromosomal aberrations in pesticide sprayers working in plastic green houses*. Mutat Res., 1992; 279(2), p. 145-148.
- Kristensson K. *Potential role of viruses in neurodegeneration*. Mol Chem Neuropathol., 1992; 16(1-2), p. 45-58.
- Kuberk PB, Robillard PD. *Communicating drinking water health risk: an information system that may help the process*. J Environ Health, 1993; 55(5), p. 24-26.
- Kukull WA, Larson EB, Bowen JD, McCormick WC, Teri L, Pfanschmidt ML, Thompson JD, O'Meara ES, Brenner DE, van Belle G. *Solvent exposure as a risk factor for Alzheimer's disease: a case-control study*. Am J Epidemiol., 1995; 141(1), p. 1059-1071.
- Kunz R, Khan KS, Neumayer HH. *Observational studies and randomized trials*. N Engl J Med., 2000, 343 (16), p. 1194-1197.
- Kuopio AM, Marttila RJ, Helenius H, Rinne UK. *Environmental risk factors in Parkinson's disease*. Mov Disord., 1999; 14(6), p. 928-939.
- Kurland LT, Mulder DW. *Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geographic distribution and special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations*. Neurology, 1954; 4(5), p. 355-378; 4(6), p. 438-448.

- L'Abbé KA, Detsky AS, O'Rourke K. *Meta-analysis in clinical research*. Ann Intern Med., 1987; 107(2), p. 224–233.
- Lai BC, Marion SA, Teschke K, Tsui JK. *Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease*. Parkinsonism Relat Disord., 2002; 8(5), p. 297-309.
- Laird NM, Mosteller F. *Some statistical methods for combining experimental results*. Int J Technol Assess Health Care, 1990; 6(1), p. 5-30.
- Landrigan PJ, Whitworth RH, Baloh RW, Staehling NW, Barthel WF, Rosenblum BF. *Neuropsychological dysfunction in children with chronic low-level lead absorption*. Lancet, 1975; 1(7909), p. 708–712.
- Landrigan PJ. *Use of human data in risk assessment*. In: Principles for the assessment of risk from exposure to chemicals. Geneva: International Programme for Chemical Safety, World Health Organization. 1994.
- Landrigan PJ, Goldman LR. *Report of a panel on the relationship between public exposure to pesticides and cancer*. Cancer, 1998; 83(5), p. 1057-1060.
- Landrigan PJ, Graham DG, Thomas RD. *Environmental neurotoxic illness: research for prevention*. Environ Health Perspect., 1994; 102(2), p. 117-120.
- Landrigan PJ, Kimmel CA, Correa A, Eskenazi B. *Children's health and the environment: public health issues and challenges for risk assessment*. Environ Health Perspect., 2004; 112(2), p. 257-265.
- Landrigan PJ, Sonawane B, Butler RN, Trasande L, Callan R, Droller D. *Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life*. Environ Health Perspect, 2005; 113(9), p. 1230-1233.
- Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. *Chronic parkinsonism in humans due to a product of meripidine-analog synthesis*. Science, 1983; 219(4587), p. 979-980.
- Langston JW, Ballard P. *Parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): implications for treatment and the pathogenesis of Parkinson's disease*. Can J Neurol Sci., 1984; 11(1 Suppl), p. 160-165.
- Langston JW, Ballard PA Jr. *Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine*. N Engl J Med., 1983; 309(5), p. 310.
- Langston JW, Forno LS, Rebert CS, Irwin I. *Selective nigral toxicity after systemic administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the squirrel monkey*. Brain Res., 1984; 292(2), p. 390-394.
- Langston JW, Forno LS, Tetrud J, Reeves AG, Kaplan JA, Karluk D. *Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure*. Ann Neurol., 1999; 46(4), p. 598–605.
- Langston JW, Irwin I, Langston EB, Forno LS. *1-Methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺): identification of a metabolite of MPTP, a toxin selective to the substantia nigra*. Neurosci Lett., 1984; 48(1), p. 87-92.

- Lanphear BP, Vorhees CV, Bellinger DC. *Protecting children from environmental toxins*. PLoS Med., 2005; 2(3), p. e61.
- Last J. *A dictionary of epidemiology, 3rd edition*. Oxford: Oxford University Press. 1995.
- Lau J, Ioannidis JP, Terrin N, Schmid CH, Olkin I. *The case of the misleading funnel plot*. BMJ, 2006; 333(7568), p. 597–600.
- Le Couteur DG, McLean AJ, Taylor MC, Woodham BL, Board PG. *Pesticides and Parkinson's disease*. Biomed Pharmacother., 1999, 53(3), p. 122-130.
- Legault ML, Murphy DJ. *Evaluation of the Agricultural Safety and Health Best Management Practices Manual*. J Agric Saf Health., 2000; 6(2), p. 141-153.
- Lemeshow AR, Blum RE, Berlin JA, Stoto MA, Colditz GA. *Searching one or two databases was insufficient for meta-analysis of observational studies*. J Clin Epidemiol, 2005; 58(9), p. 867-873.
- Lewis S, Clarke M. *Forest plots: trying to see the wood and the trees*. BMJ, 2001; 322(7300), p. 1479–1480.
- Li AA, Mink PJ, McIntosh LJ, Teta MJ, Finley B. *Evaluation of epidemiologic and animal data associating pesticides with Parkinson's disease*. J Occup Environ Med., 2005; 47(10), p. 1059–1087.
- Lilienfeld DE, Stolley PD. *Foundations of epidemiology, 3rd edition*. New York: Oxford University Press. 1994.
- Lilienfeld DE, Perl DP, Olanow CW. *Guam degeneration*. In: Neurodegenerative diseases, D.Calne (ed), WB Saunders Company, Philadelphia. 1994, p. 895-908.
- Lindström B. *Quality of life: a model for evaluating health for all. Conceptual considerations and policy implications*, Soz Prevntivmed., 1992; 37(6), p. 301-306.
- Lindström B, Eriksson M. *Salutogenesis*. J Epidemiol Community Health, 2005; 59(6), p. 440-442
- Liou HH, Chen RC, Chen THH, Tsai YF, Tsai MC. *Attenuation of paraquat-induced dopaminergic toxicity on the substantia nigra by (-)-deprenyl in vivo*. Toxicol Appl Pharmacol., 2001; 172(1), p. 37–43.
- Liou HH, Tsai MC, Chen CJ, Jeng JS, Chang YC, Chen SY, Chen RC. *Environmental risk factors for Parkinson's disease: a case-control study in Taiwan*. Neurology, 1997; 48(6), p. 1583-1588.
- Lioy PJ. *Assessing total human exposure to contaminants*. Environ Sci Technol., 1990; 24, p. 938-945.
- Lipsett M, Campleman S. *Occupational exposure to diesel exhaust and lung cancer: a meta-analysis*. Am J Public Health, 1999; 89(7), p. 1009-1017.
- Litteljohn D, Mangano E, Clarke M, Bobyn J, Moloney K, Hayley S. *Inflammatory mechanisms of neurodegeneration in toxin-based models of Parkinson's disease*. Parkinsons Dis., 2010; 2011(713517), p. 1-18.

- Litvan I, Booth V, Wenning GK, Bartko JJ, Goetz CG, McKee A, Jankovic J, Jellinger K, Lai EC, Brandle JP, Verny M, Chaudhuri KR, Pearce RK, Agid Y. *Retrospective application of a set of clinical diagnostic criteria for the diagnosis of multiple system atrophy*. J Neural Transm., 1998; 105(2-3), p. 217-227.
- Liu B, Du L, Hong JS. *Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation*. J Pharmacol Exp Ther., 2000; 293(2), p. 607-617.
- Liu B, Gao H, Hong J. *Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation*. Environ Health Perspect., 2003; 111(8), p. 1065-1073.
- Liu B, Hong JS. *Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention*. J Pharmacol Exp Ther., 2003; 304(1), p. 1-7.
- Liu B. *Modulation of microglial pro-inflammatory and neurotoxic activity for the treatment of Parkinson's disease*. AAPS J., 2006; 8(3), p. E606-E621.
- Loehr R, Lash J. *Reducing risk: setting priorities and strategies for environmental protection*. Washington, DC: Environmental Protection Agency, Science Advisory Board. 1990.
- Logroscino G. *The role of early life environmental risk factors in Parkinson disease: what is the evidence?* Environ Health Perspect., 2005; 113(9), p. 1234-1238.
- Lomas J. *Diffusion, dissemination, and implementation: who should do what?* Ann N Y Acad Sci., 1993; 703, p. 226-235; 235-237.
- Longnecker MP. *Point/counterpoint: meta-analysis of observational studies*. Am J Epidemiol, 1995; 142(7), p. 779-782.
- Lopalco PL, Tozzi AE. *Epidemiologia facile*, Il Pensiero Scientifico. 2007.
- Lopez-Espinosa MJ, Granada A, Carreno J, Salvatierra M, Olea-Serrano F, Olea N. *Organochlorine pesticides in placentas from Southern Spain and some related factors*. Placenta, 2007; 28(7), p. 631-638.
- Lotharius J, O'Malley KL. *The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity*. J Biol Chem., 2000; 275(49), p. 38581-38588.
- Louis ED, Marder K, Cote L, Tang M, Mayeux R. *Mortality from Parkinson's disease*. Arch Neurol., 1997; 54(3), p. 260-264.
- Lowe CR, Kostrzewski J. *Epidemiology: a guide to teaching methods*. London: Churchill Livingstone. 1973.
- Lubin JH, Colt JS, Camann D, Davis S, Cerhan JR, Severson RK, Bernstein L, Hartge P. *Epidemiologic evaluation of measurement data in the presence of detection limits*. Environ Health Perspect, 2004; 112(17), p. 1691-1696.
- Lucchini R, Albini E, Cortesi I, Placidi D, Bergamaschi E, Traversa F, Alessio L. *Assessment of neurobehavioral performance as function of current and*

- cumulative occupational lead exposure*. *Neurotoxicology*, 2000; 21(5), p. 805-812.
- Ludolph AC, Spencer PS. *Toxic neuropathies and their treatment*. *Baillieres Clin Neurol.*, 1995; 4(3), p. 505-527.
- Lukiw WJ. *Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus*. *Neuroreport.*, 2007; 18(3), p. 297-300.
- Lwanga SK, Lemeshow S. *Sample size determination in health studies - a practical manual*. Geneva: World Health Organization. 1991.
- Macaskill P, Walter SD, Irwig L. *A comparison of methods to detect publication bias in meta-analysis*. *Stat Med.*, 2001; 20(4), p. 641-654.
- Macmahon B, Monson RR, Wang HH, Zheng TZ. *A second follow-up of mortality in a cohort of pesticide applicators*. *J Occup Med.*, 1988, 30(5), p. 429-432.
- Maes et al. *The contribution of lead in drinking-water to levels of blood lead I: a cross-sectional study*. 1991.
- Mahoney MJ. *Publication prejudices: An experimental study of confirmatory bias in the peer review system*. *Cognitive Therapy & Research*, 1977; 1, p. 161-175.
- Maldonado G, Greenland S. *Simulation study of confounder-selection strategies*. *Am J Epidemiol.*, 1993; 138(11), p. 923-936.
- Mann CC. *Can meta-analysis make policy?* *Science*, 1994; 266(5187), p. 960-962.
- Manning-Bog AB, McCormack AL, Li J, Uversky VN, Fink AL, Di Monte DA. *The herbicide paraquat causes up-regulation and aggregation of alpha-synuclein in mice: paraquat and alpha-synuclein*. *J Biol Chem.*, 2002; 277(3), p. 1641-1644.
- Mantel N, Haenszel W. *Statistical aspects of the analysis of data from retrospective studies of disease*. *J Natl Cancer Inst.*, 1959; 22(4), p. 719-748.
- Mantel N. *Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration*. *Cancer Chemother Rep.*, 1966; 50(3), p. 163-170.
- Marder K, Logroschino G, Alfaro B, Mejia H, Halim A, Louis E, Cote L, Mayeux R. *Environmental risk factors for Parkinson's disease in an urban multiethnic community*. *Neurology*. 1998; 50(1), p. 279-281.
- Marlenga B, Pickett W, Berge R. *Evaluation of an enhanced approach to the dissemination of the north American guidelines for children's agricultural task: a randomized controlled trial*. *Prev Med.*, 2002; 35(2), p. 150-159.
- Maroni M, Colosio C, Fait A, Ferioli A. *Gli antiparassitari: normativa, impieghi e strategie di prevenzione*. In: Foà V, Ambrosi L. *Med del Lav.*, Torino, UTET, II ed., 2003, p. 229-260.
- Maroni M, Fait A. *Health effects in man from long-term exposure to pesticides. A review of the 1975-1991 literature*. *Toxicology*, 1993; 78(1-3), p. 1-180.
- Marttila O, Jaakkola JJ, Vilkkä V, Jäppinen P, Haahtela T. *The South Karelia air pollution study: the effects of malodorous sulfur compounds from pulp mills on*

- respiratory and other symptoms in children.* Environ Res., 1994; 66(2), p. 152-159.
- Martyn C, Gale C. *Tobacco, coffee and Parkinson's disease.* BMJ, 2003; 326(7389), p. 561-562.
- Martyn CN. *Infection in childhood and neurological diseases in adult life.* Br Med Bull., 1997; 53(1), p. 24-39.
- Matanoski G, Selevan SG, Akland G, Bornschein RL, Dockery D, Edmonds L, Greife A, Mehlman M, Shaw GM, Elliott E. *Role of exposure databases in epidemiology.* Arch Environ Health, 1992; 47(6), p. 439-446.
- Matute C, Alberdi E, Domercq M, Perez-Cerda F, Perez-Samartin A, Sanchez-Gomez MV. *The link between excitotoxic oligodendroglial death and demyelinating diseases.* Trends Neurosci., 2001; 24(4), p. 224-230.
- Mayeux R, Tang MX, Marder K, Côté LJ, Stern Y. *Smoking and Parkinson's disease.* Mov Disord., 1994; 9(2), p. 207-212.
- Mayeux R. *Epidemiology of neurodegeneration.* Annu Rev Neurosci., 2003; 26, p. 81-104.
- McQueen DV, Anderson LM. *What counts as evidence: issues and debates in Evaluation in Health Promotion.* Part 2 Perspectives. WHO Reg Publ Eur Ser., 2001; 92, p. 63-81.
- McCarthy S, Somayajulu M, Sikorska M, Borowy-Borowski H, Pandey S. *Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble coenzyme Q(10).* Toxicol Appl Pharmacol., 2004; 201(1), p. 21-31.
- McCormack AL, Thiruchelvam M, Manning-Bog AB, Thiffault C, Langston JW, Cory-Slechta DA, Di Monte DA. *Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat.* Neurobiol Dis., 2002; 10(2), p. 119-127.
- McCormack AL, Atienza JG, Johnston LC, Andersen JK, Vu S, Di Monte DA. *Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration.* J Neurochem., 2005; 93(4), p. 1030-1037.
- McDonnell L, Maginnis C, Lewis S, Pickering N, Antoniak M, Hubbard R, Lawson I, Britton J. *Occupational exposure to solvents and metals and Parkinson's disease.* Neurology, 2003; 61(5), p. 716-717.
- McGeer PL, Yasojima K, McGeer EG. *Inflammation in Parkinson's disease.* Adv Neurol., 2001; 86, p. 83-89.
- McGuire V, Longstreth WT Jr, Nelson LM, Koepsell TD, Checkoway H, Morgan MS, van Belle G. *Occupational exposures and amyotrophic lateral sclerosis. A population-based case-control study.* Am J Epidemiol., 1997; 145(12), p. 1076-1088.
- Menegon A, Board PG, Blackburn AC, Mellick GD, Le Couteur DG. *Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms.* Lancet, 1998; 352(9137), p. 1344-1346.

- Mengersen KL, Tweedie RL, Biggerstaff B. *The impact of method choice on meta-analysis*. Aust J Stat., 1995; 37(1), p. 19-44.
- Menniti-Ippolito F, Spila-Alegiani S, Vanacore N, Bonifati V, Diana G, Meco G, Raschetti R. *Estimate of parkinsonism prevalence through drug prescription histories in the province of Rome, Italy*. Acta Neurol Scand., 1995; 92(1), p. 49-54.
- Mergler D, Baldwin M. *Early manifestations of manganese neurotoxicity in humans: an update*. Environ Res., 1997; 73(1-2), p. 92-100.
- Metzler DF. *Health implications of organics in groundwater*. Am J Public Health, 1982; 72(12), p. 1323-1324.
- Miettinen OS. *Estimability and estimation in case-referent studies*. Am J Epidemiol., 1976; 103(2), p. 226-235.
- Miettinen OS. *Theoretical epidemiology-principles of occurrence research in medicine*. New York: John Wiley & Sons. 1985.
- Migliore L, Coppedè F. *Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging*. Mutat Res., 2009; 674(1-2), p. 73-84.
- Migliore L, Coppedè F. *Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases*. Mutat Res., 2002; 512(2-3), p. 135-153.
- Migliore L, Coppedè F. *Genetics, environmental factors and the emerging role of epigenetics in neurodegenerative diseases*. Mutat Res., 2009; 667(1-2), p. 82-97.
- Migliore L. *Mutagenesi ambientale*. Ed., Zanichelli, Bologna. 2004.
- Miles MB, Huberman AM. *Qualitative data analysis: an expanded sourcebook*. Thousand Oaks, CA: Sage Publications. 1994.
- Miller GW. *Paraquat: the red herring of Parkinson's disease research*. Toxicol Sci., 2007; 100(1), p. 1-2.
- Milo R, Kahana E. *Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment*. Autoimmun Rev., 2010; 9(5), p. A387-394.
- Minelli C, Thompson JR, Abrams KR, Lambert PC. *Bayesian implementation of a genetic model-free approach to the meta-analysis of genetic association studies*. Stat Med., 2005, 24(24), p. 3845-3861.
- Mitchell JD. *Amyotrophic lateral sclerosis: toxins and environment*. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord., 2000; 1(4), p. 235-250.
- Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. *Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients*. Neurosci Lett., 1994; 165(1-2), p. 208-210.
- Moher D, Jadad AR, Nichol G, Penman M, Tugwell P, Walsh S. *Assessing the quality of randomized controlled trials: an annotated bibliography of scales and checklists*. Control Clin Trials, 1995; 16(1), p. 62-73.

- Moher D, Pham B, Jones A, Cook DJ, Jadad AR, Moher M, Tugwell P, Klassen TP. *Does quality of reports of randomised trials affect estimates of intervention efficacy reported in meta-analyses?* Lancet, 1998; 352(9128), p. 609–613.
- Moja L, Moschetti I, Liberati A, Gensini GF, Gusinu R. *Understanding systematic reviews: the meta-analysis graph (also called ‘forest plot’)*. Intern Emerg Med., 2007; 2(2), p. 140–142.
- Monitoraggio nazionale dei pesticidi nelle Acque, ISPRA, Rapporti 114/2010.
- Morens DM, Davis JW, Grandinetti A, Ross GW, Popper JS, White LR. *Epidemiologic observations on Parkinson’s disease: incidence and mortality in a prospective study of middle-aged men.* Neurology, 1996, 46(4), p. 1044-1050.
- Morens DM, Grandinetti A, Davis JW, Ross GW, White LR, Reed D. *Evidence against the operation of selective mortality in explaining the association between cigarette smoking and reduced occurrence of idiopathic Parkinson’s disease.* Am J Epidemiol., 1996; 144(4), p. 400-404.
- Morens DM, Grandinetti A, Reed D, White LR, Ross GW. *Cigarette smoking and protection from Parkinson’s disease: false association or etiologic clue?* Neurology, 1995; 45(6), p. 1041-1051.
- Morens DM, Grandinetti A, Waslien CI, Park CB, Ross GW, White LR. *Case-control study of idiopathic Parkinson’s disease and dietary vitamin E intake.* Neurology, 1996; 46(5), p. 1270-1274.
- Moretto A, Colosio C. *Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of Parkinson’s disease.* NeuroToxicology, 2011; 32(4), p. 383-391.
- Morgan DP. *Recognition and management of pesticide poisoning.* EPA pub. 540/9-S8-001. Washington, DC: U.S. Government printing Office. 1986.
- Morgante L, Rocca WA, Di Rosa AE, De Domenico P, Grigoletto F, Meneghini F, Reggio A, Savettieri G, Castiglione MG, Patti F, Di Perri, for the Sicilian Neuroepidemiologic Study Group. *Prevalence of Parkinson’s disease and other types of parkinsonism: a door-to-door survey in three Sicilian municipalities.* Neurology, 1992; 42(10), p. 1901-1907.
- Morgante L, Salemi G, Meneghini F, Di Rosa AE, Epifanio A, Grigoletto F, Ragonese P, Patti F, Reggio A, Di Perri R, Savettieri G. *Parkinson’s disease survival: a population-based study.* Arch Neurol., 2000; 57(4), p. 507-512.
- Morgenstern H, Thomas D. *Principles of study design in environmental epidemiology.* Environ Health Perspect., 1993; 101(4 Suppl), p. 23-38.
- Morgenstern H. *Uses of ecologic analysis in epidemiologic research.* Am J Public Health, 1982; 72(12), p. 1336-1344.
- Muir Gray JA. *Evidence-based healthcare and Public Health.* How to make decisions about health services and public health. Churchill Livingstone. 2008.
- Mulrow CD, Oxman AD, eds. *Cochrane collaboration handbook.* In: *The Cochrane library.* The Cochrane Collaboration. Oxford: Update Software, 1997: Issue 4.

- Murray CJL, Lopez AD. *Global health statistics*. Boston: Harvard University Press, 1996.
- Murray DM. *Design and analysis of group- randomized trials: a review of recent developments*. *Ann Epidemiol.*, 1999; 7(7 Suppl), p. S69–S77.
- Musti M. *Prevenzione in agricoltura, agrozootecnica, agroindustria*. In: Foà V, Ambrosi L. *Med del Lav*. Torino, UTET, II ed., 2003, p. 601-622.
- Mutti A. *Use of intermediate end-points to prevent long-term outcomes*. *Toxicol Lett.*, 1995; 77(1-3), p. 121-125.
- Narabayashi H. *Similarity and dissimilarity of MPTP models to Parkinson's disease: importance of juvenile parkinsonism*. *Eur Neurol.*, 1987; 26(1 Suppl), p. 24-29.
- National Library of Medicine. Hazardous Substances Databank. Paraquat. 1992.
- Naylor CD. *Two cheers for meta-analysis: problems and opportunities in aggregating results of clinical trials*. *CMAJ*, 1988; 138(10), p. 891-895.
- Nee LE, Gomez MR, Dambrosia J, Bale S, Eldridge R, Polinsky RJ. *Environmental-occupational risk factors and familial associations in multiple system atrophy: a preliminary investigation*. *Clin Auton Res.*, 1991; 1(1), p. 9-13.
- Needleman HL & Gatsonis CA (1990) Low level lead exposure and the IQ of children. *Journal of the American Medical Association*, 263:673-678.
- Needleman HL, Schell A, Bellinger D, Leviton A, Allred EN. *The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. An 11-year follow-up report*. *N Engl J Med.*, 1990; 322(2), p. 83-88.
- Nefzger MD, Quadfasel FA, Karl VC. *A retrospective study of smoking in Parkinson's disease*. *Am J Epidemiol.*, 1968, 88(2), p. 149-158.
- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. *Multiple Sclerosis*. *N Engl J Med.*, 2000; 343(13), p. 938-952.
- Novick LF. *Public health practice guidelines: a case study*. *J Public Health Manag Pract.*, 1998; 4(2 Suppl), p. 59–64.
- Nuti A, Ceravolo R, Dell'Agnello G, Gambaccini G, Bellini G, Kiferle L, Rossi C, Logi C, Bonuccelli U. *Environmental factors and Parkinson's disease: a case-control study in the Tuscany region of Italy*. *Parkinsonism Relat Disord.*, 2004; 10(8), p. 481–485.
- Ohlson CG, Hogstedt C. *Parkinson's disease and occupational exposure to organic solvents, agricultural chemicals and mercury. A case-referent study*. *Scand J Work Environ Health*, 1981; 7(4), p. 252-256.
- Olanow CW, Tatton WG. *Etiology and the pathogenesis of Parkinson's disease*. *Annu Rev Neurosci*, 1999; 22, p. 123-144.
- Olanow CW. *A radical hypothesis for neurodegeneration*. *Trends Neurosci.*, 1993; 16(11), p. 439-444.
- Olanow CW. *Oxidation reactions in Parkinson's disease*. *Neurology*, 1990; 40(10 Suppl 3), p. 32-39.

- Olson C-G, Hogsted C. *Parkinson's disease and occupational exposure to organic solvents, agricultural chemicals and mercury – a case referent study*. Scan J Work Environ Health, 1981;7, p. 252-256.
- Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. *An inflammatory review of Parkinson's disease*. Prog Neurobiol., 2002; 68(5), p. 325-340.
- Ortona E, Margutti P. *Disfunzioni del sistema immunitario in patologie psichiatriche e neurodegenerative*. Notiziario ISS, 2007; 20(5).
- Orwin RG. *A fail-safe N for effect size in meta-analysis*. J Edu Stat., 1983; 8, p. 157-159.
- Ozonoff D, Colten ME, Cupples A, Heeren T, Schatzkin A, Mangione T, Dresner M, Colton T. *Health problems reported by residents of a neighborhood contaminated by a hazardous waste facility*. Am J Ind Med., 1987; 11(5), p. 581-597
- Padovani A, Borroni B, Colciaghi F, Pettenati C, Cottini E, Agosti C, Lenzi GL, Caltagirone C, Trabucchi M, Cattabeni F, Di Luca M. *Abnormalities in the pattern of platelet amyloid precursor protein forms in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer disease*. Arch Neurol., 2002; 59(1), p. 71–75.
- Pagano M, Gauvreau K. *Principles of biostatistics*. Belmont, California: Wadsworth, Inc. 1993.
- Palma S, Delgado-Rodriguez M. *Assessment of publication bias in meta-analyses of cardiovascular diseases*. J Epidemiol Community Health, 2005, 59(10), p. 864-869.
- Pappaioanou M, Evans C Jr. *Development of the Guide to Community Preventive Services: a US Public Health Service initiative*. J Public Health Manag Pract., 1998; 4(2), p. 48–54.
- Park RM, Schulte PA, Bowman JD, Walker JT, Bondy SC, Yost MG, Touchstone JA, Dosemeci M. *Potential occupational risks for neurodegenerative diseases*. Am J Ind Med., 2005; 48(1), p. 63-77.
- Paulson GW. *Environmental effects on the central nervous system*. Environ Health Perspect., 1977; 20, p. 75-96.
- Payami H, Larsen K, Bernard S, Nutt J. *Increased risk of Parkinson's disease in parents and siblings of patients*. Ann Neurol., 1994; 36(4), p. 659-661.
- Pearce N, Checkoway H. *A simple computer program for generating person-time data in cohort studies involving time-related factors*. Am J Epidemiol., 1987; 125(6), p. 1085-1091.
- Pearce N. *Analytic implications of epidemiological concepts of interaction*. Int J Epidemiol., 1989; 18(4), p. 976-980.
- Pearson K. *On a method of determining whether a sample of size n supposed to have been drawn from a parent population having a known probability integral has probably been drawn at random*. Biometrika, 1933; 25, p. 379–410.

- Perera F, Mayer J, Santella RM, Brenner D, Jeffrey A, Latriano L, Smith S, Warburton D, Young TL, Tsai WY, et al. *Biologic markers in risk assessment for environmental carcinogens*. *Environ Health Perspect.*, 1991; 90, p. 247-254.
- Perry VH, Cunningham C, Holmes C. *Systemic infections and inflammation affect chronic neurodegeneration*. *Nat Rev Immunol.*, 2007; 7(2), p. 161–167.
- Peters JL, Sutton AJ, Jones DR, Abrams KR, Rushton L. *Performance of the trim and fill method in the presence of publication bias and between study heterogeneity*. *Stat Med.*, 2007; 26(25), p. 4544–4562.
- Petitti D. *Meta-analysis and endocrinology*. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, 1997; 26(1), p. 31-44.
- Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV, Mantel N, McPherson K, Peto J, Smith PG. *Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient: II analysis and examples*. *Br J Cancer*; 1975; 35(1), p. 1-39.
- Pierce CA. *Software Review: Borenstein M, Hedges LV, Higgins JPT, Rothstein HR. Comprehensive Meta-Analysis (Version 2.2.027). 2006. [Computer software]. Englewood, NJ: Biostat. Organizational Research Methods 2008; 11(1), p. 188-191.*
- Plassman BL, Williams JW Jr, Burke JR, Holsinger T, Benjamin S. *Systematic review: factors associated with risk for and possible prevention of cognitive decline in later life*. *Ann Intern Med.*, 2010; 153(3), p. 182-193.
- Plato CC, Garruto RM, Galasko D, Craig UK, Plato M, Gamst A, Torres JM, Wiederholt W. *Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam: changing incidence rates during the past 60 years*. *Am J Epidemiol.*, 2003; 157(2), p. 149-157.
- Pocock SJ, Trivison TG, Wruck LM. *Figures in clinical trial reports: current practice & scope for improvement*. *Trials*, 2007; 8(36), p. 1-17.
- Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS. *Environmental risk factors and Parkinson's disease: a meta-analysis*. *Environ Res.*, 2001; 86(2), p. 122-127.
- Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Shrivastava S. *A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides*. *Neurotoxicology*, 2000; 21(4), p. 435-440.
- Rajput AH. *Frequency and cause of Parkinson's disease*. *Can J Neurol Sci.*, 1992; 19, p. 103–107.
- Rajput AH, Offord KP, Beard CM, Kurland LT. *Epidemiology of parkinsonism: incidence, classification, and mortality*. *Ann Neurol.*, 1984; 16(3), p. 278-282.
- Rajput AH, Offord KP, Beard CM, Kurland LT. *A case-control study of smoking habits, dementia, and other illnesses in idiopathic Parkinson's disease*. *Neurology*, 1987; 37(2), p. 226-232.

- Rajput AH, Uitti RJ, Stern W, Lavery W, O'Donnell K, O'Donnell D, Yuen WK, Dua A. *Geography, drinking water chemistry, pesticides and herbicides and the etiology of Parkinson's disease*. *Can J Neurol Sci.*, 1987; 14(3 suppl), p. 414–418.
- Rautiainen RH, Lange JL, Hodne CJ, Schneiders S, Donham KJ. *Injury in the Iowa certified Safe farm study*. *J Agric Saf Health*, 2004, 10(1), p. 51-63.
- Richardson JR, Quan Y, Sherer TB, Greenamyre JT, Miller GW. *Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone*. *Toxicol Sci.*, 2005; 88(1), p. 193–201.
- Richardson JR, Shalat SL, Buckley B, Winnik B, O'Suilleabhain P, Diaz-Arrastia R, Reisch J, German DC. *Elevated serum pesticide levels and risk of Parkinson disease*. *Arch Neurol.*, 2009; 66(7), p. 870-875.
- Ried K. *Interpreting and understanding meta-analysis graphs—a practical guide*. *Aust Fam Physician.*, 2006; 35(8), p. 635–638.
- Riggs JE. *Cigarette smoking and Parkinson's disease: the illusion of a neuroprotective effect*. *Clin Neuropharmacol.*, 1992; 15(2), p. 88-99.
- Rita P, Reddy PP, Reddy SV. *Monitoring of workers occupationally exposed to pesticides in grape gardens of Andhra Pradesh*. *Environ Res.*, 1987; 44(1), p. 1-5.
- Ritter L. *Report of a Panel on the Relationship between Public Exposure to Pesticides and Cancer*. *Cancer*, 1997, 80(10), p. 2019-2033.
- Ritz B, Costello S. *Geographic model and biomarker-derived measures of pesticide exposure and Parkinson's disease*. *Ann N Y Acad Sci.*, 2006; 1076, p. 378–387.
- Ritz B. *Environmental toxins and neurodegenerative diseases: a challenge for epidemiologists*. *Epidemiology*, 2006; 17(1), p. 2-3.
- Ritz BR, Manthripragada AD, Costello S, Lincoln SJ, Farrer MJ, Cockburn M, Bronstein J. *Dopamine transporter genetic variants and pesticides in Parkinson's disease*. *Environ Health Perspect.*, 2009; 117(6), p. 964-969.
- Robinson L, Hutchings D, Corner L, Beyer F, Dickinson H, Vanoli A, Finch T, Hughes J, Ballard C, May C, Bond J. *A systematic literature review of the effectiveness of non-pharmacological interventions to prevent wandering in dementia and evaluation of the ethical implications and acceptability of their use*. *Health Technol Assess.*, 2006; 10(26):iii, p. ix-108.
- Rom W. ed. *Environmental and occupational medicine, 3rd edition*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1998, p. 1157-1172.
- Rootman I, Goodstet M, Potvin L, Springett J. *A framework for health promotion evaluation*. *WHO Reg Publ Eur Ser.*, 2001; 92, p. 7-38.
- Rootman I. *Introduction to the book, in Evaluation in Health Promotion. Part 1. Introduction and framework*. *WHO Reg Publ Eur.*, 2001; 92, 5.
- Rosati G, Granieri E, Pinna L, Aiello I, Tola R, De Bastiani P, Pirisi A, Devoto MC. *The risk of Parkinson's disease in Mediterranean people*. *Neurology*, 1980; 30(3), p. 250-255.

- Rosenkranz HS. *Experimental and computational strategies for the rapid identification of environmental carcinogens*. In: Rom W, ed. *Environmental and occupational medicine*, 3rd edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1998, p. 197-207.
- Rosenstock L, Cullen M. ed. *Textbook of clinical occupational and environmental medicine*. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 1994.
- Rosenthal R. *The “file drawer problem” and tolerance for null results*. *Psychol Bull.*, 1979; 86(3), p. 638-641.
- Rosner B. *Fundamentals of biostatistics, 2nd edition*. Boston: Duxbury Press. 1986.
- Ross CA, Smith WW. *Gene-environment interactions in Parkinson’s disease*. *Parkinsonism Relat Disord*. 2007; 13(3 Suppl), p. S309–S315.
- Rossmann TG. *Arsenic*. In: Rom WN, ed. *Environmental and occupational medicine*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1998, p. 1011-1019.
- Rothman KJ, Greenland S. *Modern Epidemiology*. 2d ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1998.
- Rothman KJ. *Modern epidemiology*. Boston: Little, Brown, and Company, 1986.
- Rothman KJ. *Epidemiology. An Introduction*. New York, Oxford University Press, 2002, p 101–105, 144–158.
- Rothstein H, Sutton AJ, Borenstein M. *Publication Bias in Meta-Analysis: Prevention, Assessment and Adjustments*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd; 2005.
- Rothwell CJ, Hamilton CB, Leaverton PE. *Identification of sentinel health events as indicators of environmental contamination: report of a consensus development conference*. *Environ Health Perspect.*, 1991; 94, p. 261-263.
- Rugbjerg K, Harris MA, Shen H, Marion SA, Tsui JK, Teschke K. *Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease--a population-based case-control study evaluating the potential for recall bias*. *Scand J Work Environ Health*, 2011; 37(5), p. 427-436.
- Rull RP, Ritz B, Shaw GM. *Neural tube defects and maternal residential proximity to agricultural pesticide applications*. *Am J Epidemiol.*, 2006; 163(8), p. 743-753.
- Rupa DS, Reddy PP, Reddi OS. *Frequencies of chromosomal aberrations in smokers exposed to pesticides in cotton fields*. *Mutat Res.*, 1989; 222(1), p. 37-41.
- Rybicki BA, Johnson CC, Peterson EL, Kortsha GX, Gorrel JM. *A family history of Parkinson’s disease and its effects on other Parkinson’s disease risk factors*. *Neuroepidemiology*, 1999; 18(5), p. 270-278.
- Rychetnik L, Frommer M, Hawe P, Shiell A. *Criteria for evaluating evidence on public health interventions*. *J Epidemiol Community Health*, 2002; 56(2), p. 119-127.

- Rychetnik L, Frommer M. *A schema for evaluating evidence on public health interventions*. Version 4. National Public Health Partnership. Melbourne, 2002.
- Sackett DL, Richardson WS, Rosenberg W, Haynes RB. *Evidence – based medicine: how to practice and teach EBM*. New York: Churchill Livingstone, 1997.
- Sackett DL, Rosenberg WM, Gray JA, Haynes RB, Richardson WS. *Evidence based medicine: what it is and what it isn't*. BMJ, 1996; 312(7023), p. 71-72.
- Salemi G, Savettieri G, Rocca WA, Meneghini F, Saporito V, Morgante L, Reggio A, Grigoletto F, Di Perri R. *Prevalence of essential tremor: a door-to-door survey in Terrasini, Sicily. Sicilian Neuro-Epidemiologic Study Group*. Neurology, 1994; 44(1), p. 61-64.
- Sasco AJ, Paffenbarger RS Jr. *Smoking and Parkinson's disease*. Epidemiology, 1990; 1(6), p. 460-465.
- Sayre LM, Smith MA, Perry G. *Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease*. Curr Med Chem., 2001; 8(7), p. 721-738.
- Sayre LM, Moreira PI, Smith MA, Perry G. *Metal ions and oxidative protein modification in neurological disease*. Ann Ist Super Sanita. 2005; 41(2), p. 143-164.
- Schenker MB et al. *Pesticides*. In: Rom W, ed. Environmental and occupational medicine. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1998, p. 1157-1172.
- Schlesselman JJ. *Case-control Studies. Design, conduct and analysis*. Oxford university press, Oxford. 1982.
- Schmechel DE, Browndyke J, Ghio A. *Strategies for dissecting genetic-environmental interactions in neurodegenerative disorders*. Neurotoxicology, 2006; 27(5), p. 637-657.
- Schoenberg BS, Anderson DW, Harer AF. *Prevalence of Parkinson's disease in the Biracial Population of Copiah County, Mississippi*. Neurology, 1985; 35(6), p. 841-845.
- Schoenberg BS. *Environmental risk factors for Parkinson's disease: the epidemiologic evidence*. Can J Neurol Sci. 1987; 14(3 Suppl), p.407-413.
- Schottenfeld D, Fraumeni J. *Cancer epidemiology and prevention. 2nd edition*. New York: Oxford University Press. 1996.
- Schulte PA, Burnett CA, Boeniger MF, Johnson J. *Neurodegenerative diseases*. Am J Public Health, 1996; 86(9), p. 1281-1288.
- Schulz JB, Klockgether T, Petersen D, Jauch M, Muller-Schauenburg W, Spieker S, Voigt K, Dichgans J. *Multiple system atrophy: natural history, MRI morphology, and dopamine receptor imaging with 123 IBZM-SPECT*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1994; 57(9), p. 1047-1056.
- Schulz JB, Matthews RT, Beal MF. *Role of nitric oxide in neurodegenerative diseases*. Curr Opin Neurol., 1995; 8(6), p. 480-486.

- Schwab RS, England AC. *Parkinsonism due to various specific causes*. In: Vinken PJ, Bruyn GW (Ed.). *Handbook of clinical neurology*. Amsterdam: North-Holland Publishing Co; 1968, p. 230-233.
- Schwartz BS, Stewart WF, Bolla KI, Simon PD, Bandeen-Roche K, Gordon PB, Links JM, Todd AC. *Past adult lead exposure is associated with longitudinal decline in cognitive function*. *Neurology*, 2000; 55(8), p. 1144–1150.
- Seawright AA. *Directly toxic effects of plant chemicals which may occur in human and animal foods*. *Nat Toxins.*, 1995; 3(4), p. 227-232.
- Seidler A, Hellenbrand W, Robra BP, Vieregge P, Nischan P, Joerg J, Oertel WH, Ulm G, Schneider E. *Possible environmental, occupational, and other etiologic factors for Parkinson's disease: a case-control study in Germany*. *Neurology*, 1996; 46(5), p. 1275-1284.
- Selvin S. *Statistical analysis of epidemiological data*. New York: Oxford University Press. 1991.
- Semchuk KK, Love EJ, Lee RG. *Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis*. *Neurology*, 1993; 46(6), p. 1173-1180.
- Semchuk KM, Love EJ, Lee RG: *Parkinson's disease and exposure to agricultural work and pesticide chemicals*. *Neurology*, 1992, 42(7), p. 1328-1335.
- Semple SE, Dick F, Cherrie JW. *Geoparkinson Study Group. Exposure assessment for a population-based case-control study combining a job-exposure matrix with interview data*. *Scand J Work Environ Health*, 2004; 30(3), p. 241-248.
- Senn SJ. *Overstating the evidence: double counting in meta-analysis and related problems*. *BMC Med Res Methodol.*, 2009; 9(10), p. 1-7.
- Settimi L, Davanzo F, Miceli G, Minnielli S, Vanacore N, Ballard TJ, Maiozzi P, Faraoni L, Cecere E. *Piano di sorveglianza nazionale per la rilevazione delle intossicazioni acute da antiparassitari*. *Ann Ist Super Sanità*, 2001; 37, p. 181-185.
- Sexton K, Ryan PB. *Assessment of human exposure to air pollution: methods, measurements and models*. In: Watson AY, Bates RR, Kennedy D. ed. *Air pollution, the automobile, and public health*. Washington, DC: National Academy Press., 1988, p. 207-238.
- Shaw GM, Schulman J, Frisch JD, Cummins SK, Harris JA. *Congenital malformations and birth weight in areas with potential environmental contamination*. *Arch Environ Health*, 1992; 47(2), p. 147-154.
- Sherer TB, Betarbet R, Greenamyre JT. *Pesticides and Parkinson's disease*. *Scientific World Journal*, 2001;1, p. 207–208.
- Sherer TB, Kim JH, Betarbet R, Greenamyre JT. *Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and alpha-synuclein aggregation*. *Exp Neurol.*, 2003; 179(1), p. 9–16.
- Shults CW, Oakes D, Kieburtz K, Beal MF, Haas R, Plumb S, Juncos JL, Nutt J, Shoulson I, Carter J, Kompoliti K, Perlmutter JS, Reich S, Stern M, Watts RL,

- Kurlan R, Molho E, Harrison M, Lew M; Parkinson Study Group. *Effects of coenzyme Q10 in early Parkinson disease: evidence of slowing of the functional decline*. Arch Neurol., 2002; 59(10), p. 1541-1550.
- Siddique T. *Molecular genetics of familial amyotrophic lateral sclerosis*. Adv Neurol., 1991; 56, p. 227-231.
- Sies H. *Oxidative stress: introductory remarks*. In: Oxidative Stress, Sies, H. ed., Academic Press, London, 1985, p. 1-9.
- Signorelli C: *Elementi di metodologia epidemiologica*. SEU, Roma, 1995.
- Simon R. *Overviews of randomized clinical trials*. Cancer Treat Rep., 1987; 71(1), p. 3-5.
- Simonsen L, Johnsen H, Lund SP, Matikainen E, Midtgard U, Wennberg A. *Methodological approach to evaluation of neurotoxicity data and the classification of neurotoxic chemicals*. Scand J Work Environ Health, 1994; 20(1), p. 1-12.
- Singer TP, Castagnoli N, Ramsay RR, Trevor AJ. *Biochemical events in the development of parkinsonism induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine*. J Neurochem, 1987; 49(1), p. 1-8.
- Singer TP, Ramsay RR. *Mechanism of the neurotoxicity of MPTP. An update*. FEBS Lett., 1990; 274(1-2), p. 1-8.
- Smargiassi A, Mutti A, De Rosa A, De Palma G, Negrotti A, Calzetti S. *A case-control study of occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease in the Emilia-Romagna region of Italy*. Neurotoxicology, 1998; 19(4-5), p. 709-712.
- Smith TC, Spiegelhalter DJ, Thomas A. *Bayesian approaches to random-effects meta-analysis: a comparative study*. Stat Med., 1995, 14(24), p. 2685-2699.
- Smith ML. *Publication bias and meta-analysis*. Evaluation in Education, 1980; 4, p. 22-24.
- Song F, Eastwood AJ, Gilbody S, Duley L, Sutton AJ. *Publication and related biases*. Health Technol Assess., 2000; 4(10), p. 1-115.
- Song F, Khan KS, Dinnes J, Sutton AJ. *Asymmetric funnel plots and publication bias in meta-analyses of diagnostic accuracy*. Int J Epidemiol., 2002; 31(1), p. 88-95.
- Song F. *Exploring heterogeneity in meta-analysis: is the L'Abbé plot useful?* J Clin Epidemiol., 1999; 52(8), p. 725-730.
- Soskolne CL. *Epidemiology: questions of science, ethics, morality and law*. Am J Epidemiol., 1989; 129(1), p. 1-18.
- Soskolne CL. ed. *Ethics and law in environmental epidemiology*. J Exp Analysis Environ Epidemiol., 1993; 3(1 Supp1), p. 297-320.
- Souza JP, Pileggi C, Cecatti JG. *Assessment of funnel plot asymmetry and publication bias in reproductive health meta-analyses: an analytic survey*. Reprod Health, 2007; 4(3).

- Sparks PJ, Cooper M. *Risk characterization, risk communication, and risk management. The role of the occupational and environmental medicine physician.* J Occup Med., 1993; 35(1), p. 13-17.
- Spencer PS, Schaumburg HH. *An expanded classification of neurotoxic responses based on cellular targets of chemical agents.* Acta Neurol Scand. Suppl., 1984, 100, p. 9-19.
- Spencer PS. *Food toxins, ampa receptors, and motor neuron diseases.* Drug Metab Rev., 1999; 31(3), p. 561-587.
- Springett J. *Practical Guidance on evaluating Health Promotion.* Brighton, 1998.
- Stave C, Torner M, Eklof M. *An intervention method for occupational safety in farming - evaluation of the effect and process.* Appl Ergon., 2007; 38(3), p. 357-368.
- Steinberg KK, Smith SJ, Stroup DF, Olkin I, Lee NC, Williamson GD, Thacker SB. *Comparison of effect estimates from a meta-analysis of summary data from published studies and from a meta-analysis using individual patient data for ovarian cancer studies.* Am J Epidemiol., 1997; 145(10), p. 917-925.
- Stern M, Dulaney E, Gruber SB, Golbe L, Bergen M, Hurtig H, Gollomp S, Stolley P. *The epidemiology of Parkinson's disease. A case-control study of young-onset and old-onset patients.* Arch Neurol., 1991; 48(9), p. 903-907.
- Stern MB. *Head trauma as a risk factors for Parkinson's disease.* Mov Disord., 1991; 6(2), p. 95-97.
- Sterne JA, Egger M. *Funnel plots for detecting bias in meta-analysis: guidelines on choice of axis.* J Clin Epidemiol., 2001; 54(10), p. 1046–1055.
- Sterne JA, Gavaghan D, Egger M. *Publication and related bias in meta-analysis: power of statistical tests and prevalence in the literature.* J Clin Epidemiol., 2000; 53(11), p. 1119–1129.
- Stroup DF, Berlin JA, Morton SC, Olkin I, Williamson GD, Rennie D, Moher D, Becker BJ, Sipe TA, Thacker SB. *Meta-analysis of observational studies in epidemiology: a proposal for reporting. Meta-analysis Of Observational Studies in Epidemiology (MOOSE) group.* JAMA, 2000; 283(15), p. 2008-2012.
- Sturchio E, Boccia P, Casorri L, Ficociello B, Zanellato M, Beni C, Aromolo R, Marconi S, Ferrazza P, Leto V, Ciampolillo P. *Indicatori ambientali microbici e vegetali per la determinazione dello stato di salute ambientale in seguito a rilascio di inquinanti dovuto al "fall out".* Ingegneria Ambientale. 2007; 36(4), p. 164-174.
- Sturchio E, Boccia P, Ficociello B, Riccardi C, Spicaglia S, De Simone C, Marconi S, Errichetti MF, Pezzella M. *Mutagenesis and molecular analysis to monitor the effects of chemical released in the environment.* Fresenius environmental bulletin, 2004; 13(12), p. 1–10.
- Sun F, Kanthasamy A, Anantharam V, Kanthasamy AG. *Environmental neurotoxic chemicals-induced ubiquitin proteasome system dysfunction in the pathogenesis and progression of Parkinson's disease.* Pharmacol Ther., 2007; 114(3), p. 327-344.

- Sutton AJ, Abrams KR, Jones DR, et al. *Methods for Meta-Analysis in Medical Research*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd. 2000.
- Syburra C, Passi S. *Oxidative stress in patients with multiple sclerosis*. Ukr Biokhim Zh., 1999; 71(3), p. 112-115.
- Takahashi M, Yamada T, Nakajima S, Nakajima K, Yamamoto T, Okada H. *The substantia nigra is major target for neurovirulent influenza A virus*. J Exp Med., 1995; 181(6), p. 2161-2169.
- Tan EK, Khajavi M, Thornby JI, Nagamitsu S, Jankovic J, Ashizawa T. *Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease*. Neurology, 2000; 55(4), p. 533–538.
- Tanner CM, Ben-Shlomo Y. *Epidemiology of Parkinson's disease*. Adv Neurol., 1999; 80, p. 153–159.
- Tanner CM, Chen B, Wang W, Peng M, Liu Z, Liang X, Kao LC, Gilley DW, Goetz CG, Schoenberg BS. *Environmental factors and Parkinson's disease: a case-control study in China*. Neurology, 1989; 39(5), p. 660–664.
- Tanner CM. *The role of environmental toxins in the etiology of Parkinson's disease*. Trends Neurosci., 1989; 12(2), p. 49-54.
- Tanner CM, Kamel F, Ross GW, Hoppin JA, Goldman SM, Korell M, Marras C, Bhudhikanok GS, Kasten M, Chade AR, Comyns K, Richards MB, Meng C, Priestley B, Fernandez HH, Cambi F, Umbach DM, Blair A, Sandler DP, Langston JW. *Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease*. Environ Health Perspect. 2011; 119(6), p. 866-872.
- Tanner CM, Ross GW, Jewell SA, Hauser RA, Jankovic J, Factor SA, Bressman S, Deligtisch A, Marras C, Lyons KE, Bhudhikanok GS, Roucoux DF, Meng C, Abbott RD, Langston JW. *Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study*. Arch Neurol., 2009; 66(9), p. 1106-1113.
- Tanner CM. *Advances in environmental epidemiology*. Mov Disord., 2010; 25 (Suppl 1), p. 58-62.
- Taylor CA, Saint-Hilaire MH, Cupples LA, Thomas CA, Burchard AE, Feldman RG, Myers RH. *Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study*. Am J Med Genet., 1999; 88(6), p. 742-749.
- Teräväinen H, Forgach L, Hietanen M, Schulzer M, Schoenberg B, Calne DB. *The age of onset of Parkinson's disease: etiological implications*. Can J Neurol Sci., 1986; 13(4), p. 317-319.
- Terrin N, Schmid CH, Lau J. *In an empirical evaluation of the funnel plot, researchers could not visually identify publication bias*. J Clin Epidemiol., 2005; 58(9), p. 894–901.
- Thacker SB. *Meta-analysis. A quantitative approach to research integration*. JAMA, 1988; 259(11), p. 1685-1689.

The Cochrane Collaboration. *The Cochrane database of systematic reviews*. Vol. 2. 1999.

The Development of a European Health Promotion Monitoring System (March 2004) The EUHPID Project Final Report to the European Commission, DG SANCO by J.K. Davies, International Health Development Research Centre, Faculty of health, University of Brighton, United Kingdom. 2004.

The European Commission/IUHPE, *The Evidence of Health Promotion Effectiveness. Shaping Public Health in a New Europe*, part 2, 2000.

The European Network for the Promotion of Health-Enhancing Physical Activity, *Guidelines for Health-Enhancing Physical Activity Promotion Programmes*, written by Charlie Foster, British Heart Foundation Health Promotion Research Group, 2000.

The Task Force on Community Preventive Services. *The guide to community preventive services*.

Thiruchelvam M, Brockel BJ, Richfield EK, Baggs RB, Cory-Slechta DA. *Potentiated and preferential effects of combined paraquat and maneb on nigrostriatal dopamine systems: environmental risk factors for Parkinson's disease?* Brain Res., 2000; 873(2), p. 225–234.

Thiruchelvam M, McCormack A, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Di Monte DA, Cory-Slechta DA. *Age-related irreversible progressive nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity in the paraquat and maneb model of the Parkinson's disease phenotype*. Eur J Neurosci., 2003; 18(3), p. 589–600.

Thiruchelvam M, Richfield EK, Baggs RB, Tank AW, Cory-Slechta DA. *The nigrostriatal dopaminergic system as a preferential target of repeated exposures to combined paraquat and maneb: implications for Parkinson's disease*. J Neurosci., 2000; 20(24), p. 9207–9214.

Thiruchelvam M, Richfield EK, Goodman BM, Baggs RB, Cory-Slechta DA. *Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype*. Neurotoxicology, 2002; 23(4-5), p. 621–633.

Thomas B, Beal MF. *Parkinson's disease*. Hum Mol Genet., 2007; 16(Spec 2), p. R183–R194.

Thompson SG, Pocock SJ. *Can meta-analyses be trusted?* Lancet, 1991; 338(8775), p. 1127-1130.

Thompson SG. *Why sources of heterogeneity in meta-analysis should be investigated*. BMJ, 1994; 309(6965), p. 1351–1355.

Thorn A, Gustavsson P, Sadigh J, Westerlund-Hannestrand B, Hogstedt C. *Mortality and cancer incidence among Swedish lumberjacks exposed to phenoxy herbicides*. Occup Environ Med, 2000, 57(10), p. 718-20.

Thorsen P, Jensen IP, Jeune B, Ebbesen N, Arpi M, Bremmelgaard A, Møller BR. *Few microorganisms associated with bacterial vaginosis may constitute the pathologic core: a population-based microbiologic study among 3596 pregnant women*. Am J Obstet Gynecol., 1998; 178(3), p. 580–587.

- Tong S, Baghurst P, McMichael A, Sawyer M, Mudge J. *Lifetime exposure to environmental lead and children's intelligence at 11-13 years: the Port Pirie cohort study*. *BMJ*, 1996; 312(7046), p. 1569-1575.
- Torres C, Ribas G, Xamena N, Creus A, Marcos R. *Genotoxicity of four herbicides in the Drosophila wing spot test*. *Mutat Res*, 1992, 280 (4), p. 291-295.
- Truman BI, Smith-Akin CK, Hinman AR, Gebbie KM, Brownson R, Novick LF, Lawrence RS, Pappaioanou M, Fielding J, Evans CA Jr, Guerra FA, Vogel-Taylor M, Mahan CS, Fullilove M, Zaza S. *Developing the Guide to Community Preventive Services – overview and rationale. The Task Force on Community Preventive Services*. *Am J Prev Med.*, 2000; 18(1 Suppl), p. 18–26.
- Tsui JK, Calne DB, Wang Y, Schulzer M, Marion SA. *Occupational risk factors in Parkinson's disease*. *Can J Public Health*, 1999; 90(5), p. 334-337.
- Tukey JW. *Exploratory Data Analysis*. Reading, MA: Addison-Wesley, 1977.
- Tzourio C, Rocca WA, Breteler MM, Baldareschi M, Dartigues JF, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran JM, Alperovitch A. *Smoking and Parkinson's disease. An age-dependent risk effect? The EUROPARKINSON Study Group*. *Neurology*, 1997; 49(5), p. 1267-1272.
- U.S. Environmental Protection Agency. Office of Drinking Water. *Paraquat Health Advisory*. August, 1987.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). *Risk assessment and management: framework for decision making*. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency (EP A1600/9-85/002). 1984.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). *Environmental equity: reducing risk for all communities*. Washington, DC: Environmental Protection Agency (EPA 230-R-92-008). 1992.
- U.S. Health and Human Services. *Healthy People 2000: national health promotion and disease prevention objectives*. US Health and Human Services Pub No PHS 91; 50212. Washington, DC: US Health and Human Services, 1990.
- U.S. Health and Human Services. *Healthy People 2010 objectives: draft for public comment*. Washington, DC: US Health and Human Services, 1998.
- U.S. Preventive Services Task Force. *Guide to clinical preventive services*. 2nd ed. Alexandria, VA: International Medical Publishing, 1996.
- Uversky V.N., Li J., Fink A.L. 2001 "Pesticides directly accelerate the rate of alphasynuclein fibril formation: a possible factor in Parkinsons disease." *FEBS Lett*; Vol. 500:105–108.
- Uversky VN, Li J, Bower K, Fink AL. *Synergistic effects of pesticides and metals on the fibrillation of α -synuclein: implications for Parkinson's disease*. *Neurotoxicology*, 2002; 23(4-5), p. 527-536.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ,

- Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW. *Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1*. *Science*, 2004; 304(5674), p. 1158-1160.
- Van Den Heuvel C, Thornton E, Vink R. *Traumatic brain injury and Alzheimer's disease: a review*. *Prog. Brain Res.*, 2007; 161, p. 303–316.
- Vanacore N, Binazzi A, Bottazzi M, Belli S. *Amyotrophic lateral sclerosis in an Italian professional soccer player*. *Parkinsonism Relat Disord.*, 2006; 12(5), p. 327-329.
- Vanacore N, Bonifati V, Bellatreccia A, Fabrizio E, Meco G. *Mortality rates for Parkinson's disease and parkinsonism in Italy (1969-1987)*. *Neuroepidemiology*, 1992; 11(2), p. 65-73.
- Vanacore N, Bonifati V, Fabbrini G, Colosimo C, De Michele G, Marconi R, Nicholl D, Locuratolo N, alarico G, Romano S, Stocchi F, Bonuccelli U, De Mari M, Vieregge P, Meco G; European Study Group on Atypical Parkinsonisms (ESGAP). *Epidemiology of multiple system atrophy. ESGAP Consortium. European Study Group on Atypical Parkinsonisms*. *Neurol Sci.*, 2001; 22(1), p. 97-99.
- Vanacore N, Bonifati V, Fabbrini G, Colosimo C, Marconi R, Nicholl D, Bonuccelli U, Stocchi F, Lamberti P, Volpe G, De Michele G, Iavarone I, Bennett P, Vieregge P, Meco G. *Smoking habits in multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. European Study Group on Atypical Parkinsonisms*. *Neurology*, 2000; 54(1), p. 114-119.
- Vanacore N, Spila-Alegiani S, Raschetti R, Meco G. *Mortality cancer risk in parkinsonian patients: a population-based study*. *Neurology*, 1999; 52(2), p. 395-398.
- Vanacore N, Zuchegna P, Bonifati V, Meco G. *Lack of correlation between pesticide consumption and parkinsonism mortality in Italy*. *Italian J Neurol Sci.*, 1993; 7(14), p. 64.
- Vanacore N., Nappo A., Gentile M., Brustolin A., Palange S., Liberati A., Di Rezze S., Caldora G., Gasparini M., Benedetti F., Bonifati V., Forastiere F., Quercia A., Meco G. *Evaluation of risk of Parkinson's disease in a cohort of licensed pesticide users*. *Neurol Sci.*, 2002; 23(2 Suppl), p. S119–S120.
- Vanini GC, Calamo-Specchia FP: *Igiene e metodologia epidemiologica*. UTET-USES, Torino. 1990.
- Verity MA. *Environmental neurotoxicity of chemicals and radiation*. *Curr Opin Neurol Neurosurg.*, 1993; 6(3), p. 437-442.
- Viechtbauer W. *Accounting for heterogeneity via random-effects models and moderator analyses in meta-analysis*. *J Psychol.*, 2007; 215(2), p. 104-121.
- Villar J, Piaggio G, Carroli G, Donner A. *Factors affecting the comparability of meta-analyses and largest trials results in perinatology*. *J Clin Epidemiol.*, 1997; 50(9), p. 997-1002.
- Vineis P. *Modelli di rischio*. Epidemiologia e causalità. Einaudi, Torino. 1990.

- Wallerstein N, Weinger M. *Health and safety education for worker empowerment*. Am J Ind Med., 1992; 22(5), p. 619-635.
- Wallerstein N. *Empowerment and health: the theory and practice of community change*. Comm Develop J., 1993; 28, p. 218-227.
- Wang MC, Bushman BJ. *Using the normal quantile plot to explore meta-analytic data sets*. Psychol Methods., 1998; 3(1), p. 46–54.
- Wang S, Moss JR, Hiller JE. *Applicability and transferability of interventions in evidence-based public health*. Health Promot Int., 2006; 21(1), p. 76-83.
- Wantland DJ, Portillo CJ, Holzemer WL, Slaughter R, McGhee EM. *The effectiveness of Web-based vs. non-Web-based interventions: a meta-analysis of behavioral change outcomes*. J Med Internet Res., 2004; 6(4), e40.
- Ward MH, Lubin J, Giglierano J, Colt JS, Wolter C, Bekiroglu N, Camann D, Hartge P, Nuckols JR. *Proximity to crops and residential exposure to agricultural herbicides in Iowa*. Environ Health Perspect., 2006, 114(6), p. 893-897.
- Ward MH, Nuckols JR, Weigel SJ, Maxwell SK, Cantor KP, Miller RS. *Identifying populations potentially exposed to agricultural pesticides using remote sensing and a Geographic Information System*. Environ Health Perspect, 2000, 108(1), p. 5-12.
- Warner TT, Schapira AH. *Genetic and environmental factors in the cause of Parkinson's disease*. Ann Neurol., 2003; 53(3 Suppl), p. S16–S25.
- Wasserteil-Smoller S. *Biostatistics and epidemiology*. Springer-Verlag, New York. 1990.
- Wechsler LS, Checkoway H, Franklin GM, Costa LG. *A pilot study of occupational and environmental risks factors for Parkinson's disease*. Neurotoxicology, 1991; 12(3), p. 387-392.
- Weed DL. *Interpreting epidemiological evidence: how meta-analysis and causal inference methods are related*. Int J Epidemiol., 2000, 29(3), p. 387-390.
- Wester RC, Maibach HI. *Disorders of the skin*. In: Tarcher AB, ed. Principles and practice of environmental medicine. New York: Plenum Medical Book Company. 1992.
- WHO *Health effects of the human environment*. Geneva: World Health Organization. 1972.
- WHO *Environmental health criteria, no.1. Mercury*. Geneva: World Health Organization. 1976.
- WHO *Environmental health criteria, no.27. Guidelines to studies in environmental epidemiology*. Geneva: World Health Organization. 1983.
- WHO *Epidemiology in occupational health*. Geneva: World Health Organization (WHO Regional Publications, European Series No.20). 1986.
- WHO *Assessment and management of environmental health hazards*. Geneva: World Health Organization. 1989.

- WHO *Surface water drainage for low-income communities*. Geneva: World Health Organization. 1991.
- WHO *Investigating environmental disease outbreaks; a training manual*. Geneva: World Health Organization. 1991.
- WHO *Problem-based training exercises for environmental epidemiology*. Group practice exercises for students. Geneva: World Health Organization. 1992.
- WHO *Major poisoning episodes from environmental chemicals*. Geneva: World Health Organization (WHO/PEP/92.19). 1992.
- WHO *Our planet, our health -report of the WHO Commission on Health and Environment*. Geneva: World Health Organization. 1992.
- WHO *Guidelines for drinking-water quality*. Geneva: World Health Organization. 1993.
- WHO *World health statistics annual*. Geneva: World Health Organization. 1993.
- WHO *Basic environmental epidemiology. Teacher 's guide for one-week training workshop*. Geneva: World Health Organization. 1994.
- WHO *Environmental health criteria. Inorganic lead*. Geneva: World Health Organization. 1995.
- WHO *Health and environment in sustainable development. Five years after the Earth Summit*. Geneva: World Health Organization. 1997.
- WHO *Safe Use of Pesticides*. Technical Report Series No. 9. Geneva: World Health Organization. 1973
- WHO *Health Promotion Glossary*. 1998.
- WHO/CEC *Health monitoring in the prevention of diseases caused by environmental factors*. Geneva: World Health Organization (WHO/PEP/89.23). 1989.
- Wileman BW, Thomson DU, Reinhardt CD, Renter DG. *Analysis of modern technologies commonly used in beef cattle production: conventional beef production versus nonconventional production using meta-analysis*. J Anim Sci., 2009; 87(10), p. 3418-3426.
- Wilson R, Crouch EA. *Risk assessment and comparison: an introduction*. Science, 1987; 236(4799), p. 267-270.
- Winneke G, Brockhaus A, Ewers U, Krämer U, Neuf M. *Results from the European multi-centre study on lead neurotoxicity in children: implications for risk assessment*. Neurotoxicol Teratol., 1990; 12(5), p. 553-559.
- Wong GF, Gray CS, Hassanein RS, Koller WC. *Environmental risk factors in siblings with Parkinson's disease*. Arch Neurol., 1991; 48(3), p. 287-289.
- Woolf SH, DiGuseppi CG, Atkins D, Kamerow DB. *Developing evidence-based clinical practice guidelines: lessons learned by the U. S. Preventive Services Task Force*. Annu Rev Public Health 1996; 17: 511–38.

- Woolf SH. *An organized analytic framework for practice guideline development: using the analytic logic as a guide for reviewing evidence, developing recommendations, and explaining the rationale*. In: McCormick KA, Moore SR, Siegel RA, eds. *Clinical practice guideline development: methodology perspectives*. Washington, DC: US Dept. of Health and Human Services, Agency for Health Care Policy and Research, 1994, p. 105–113.
- Wooten G.F. *Neurochemistry and neuropharmacology of Parkinson's disease*. In: *Movement disorders: neurologic principles and practice*. Watts RL, Koller W, Ed. New York: McGraw-Hill, 1997, p. 153–160.
- Wortman PM. *Judging research quality*. In: Cooper H, Hedges LV, eds. *The handbook of research synthesis*. New York: Russell Sage Foundation, 1994, p. 97–109.
- Wright JM, Keller-Byrne J. *Environmental determinants of Parkinson's disease*. *Arch Environ Occup Health*, 2005; 60(1), p. 32–38.
- Wu XF, Block ML, Zhang W, Qin L, Wilson B, Zhang WQ, Veronesi B, Hong JS. *The role of microglia in paraquat-induced dopaminergic neurotoxicity*. *Antioxid Redox Signal.*, 2005; 7(5-6), p. 654–661.
- Yassi A, Kjellström T, deKok T, Guidotti T. *Basic environmental health*. Geneva: World Health Organization - WHO/CRE/UNESCO/UNEP (WHO/EHG/98.19), 1998, p. 349.
- Yates F. *Contingency tables involving small numbers and the χ^2 test?* *J R Stat Soc.*, 1934; 1 Suppl, p. 217-235.
- Yoder J, Watson M, Benson WW. *Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides*. *Mutat Res.*, 1973; 21(6), p. 335-340.
- Young BB. *Neurotoxicity of Pesticides*. *J Pesticide Reform*, 1986; 6, p. 8-11.
- Yunis, Hoffman. *Birth of an errant cell: a new theory about the cause of cancer*. *Minnesota magazine, special issue: the sciences*, 1985, p. 28-33.
- Zahm SH, Ward MH, Blair A. *Pesticides and cancer*. *Occup Med.*, 1997, 12(2), p. 269-289.
- Zahm SH, Ward MH. *Pesticides and childhood cancer*. *Environ Health Perspect.*, 1998, 106(3), p. 893-908.
- Zayed J, Ducic S, Campanella G, Panniset JC, Andre P, Masson H, Roy M. *Facteurs environnementaux dans l'étiologie de la maladie de Parkinson*. *Can J Neurol Sci.*, 1990; 17, p. 286-291.
- Zaza S, Lawrence RS, Mahan CS, Fullilove M, Fleming D, Isham GJ, Pappaioanou M. *Scope and organization of the Guide to Community Preventive Services. The Task Force on Community Preventive Services*. *Am J Prev Med.*, 2000; 18(1 Suppl), p. 27–34.
- Zaza S, Wright-De Agüero LK, Briss PA, Truman BI, Hopkins DP, Hennessy MH, Sosin DM, Anderson L, Carande-Kulis VG, Teutsch SM, Pappaioanou M. *Data collection instrument and procedure for systematic reviews in the Guide to*

Community Preventive Services. Task Force on Community Preventive Services. Am J Prev Med., 2000; 18(1 Suppl), p. 44–74.

Zhang ZX, Román GC. *Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. Neuroepidemiology*, 1993; 12(4), p. 195-208.

Zorzon M, Capus L, Pellegrino A, Cazzato G, Zivadinov R. *Familial and environmental risk factors in Parkinson's disease: a case-control study in north-east Italy. Acta Neurol Scand.*, 2002; 105(2), p. 77-82.

Zuber M, Verdier-Taillefer MH, Alperovitch M, de Recondo J. *Smoking and Parkinson's disease: differences according to age at disease onset. Neuroepidemiology*, 1991; 10, p. 103-104.