



UNIVERSITÀ DI PARMA

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN  
*"Medicina Molecolare"*

CICLO XXXIV

Valutazione della correlazione tra uso di sostanze psicoattive e indicatori di metilazione del DNA e danno ossidativo agli acidi nucleici in popolazione sottoposta a stress

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. Prisco MIRANDOLA

Tutore:  
Chiar.ma Prof. ssa Rossana CECCHI

Dottorando: Luca ANZILLOTTI

Anni Accademici 2018/2019 – 2020/2021

**INDICE**

<b>INTRODUZIONE</b>	4
<b>CAPITOLO I – L’EPIGENETICA</b>	9
1.1 L’EPIGENETICA	10
1.2 LE TRASFORMAZIONI EPIGENETICHE	11
1.3 LA METILAZIONE	12
1.4 IMPRINTING GENOMICO	14
1.5 DANNO OSSIDATIVO	14
1.6 ALTERAZIONI CHIMICHE NEGLI ISTONI	15
1.7 RIMODELLATORI DELLA CROMATINA	17
1.8 RNA NON CODIFICANTE	17
1.9 INDICATORI DI STRESS OSSIDATIVO E DI METILAZIONE AGLI ACIDI NUCLEICI IN URINA	18
1.10 EPIGENETICA E MEDICINA MOLECOLARE	19
1.11 L’EPIGENETICA CLINICA COME BASE PATOLOGICA E BERSAGLIO TERAPEUTICO	21
<b>CAPITOLO II – EPIGENETICA, STRESS E TRAUMI</b>	23
2.1 STRESS ED EVENTI TRAUMATICI	24
2.2 CLASSIFICAZIONE DEI TRAUMI	25
2.3 EREDITARIETA’ DEI TRAUMI	27
2.4 PLASTICITA’ NEURONALE	29
2.5 DISTURBI SOCIO-RELAZIONALI: AGGRESSIVITA’ E CRIMINI VIOLENTI	31
<b>CAPITOLO III – L’EPIGENETICA &amp; LE SOSTANZE D’ABUSO</b>	34
3.1 SOSTANZE D’ABUSO	35
3.1.1 Cannabis	38
3.1.2 Oppioidi	38
3.1.3 Metanfetamine	40
3.1.4 Cocaina	41
3.1.5 Alcol	42
<b>CAPITOLO IV - PARTE STRUMENTALE</b>	43
4.1 STRUMENTAZIONE PER L’ANALISI DELLE MODIFICAZIONI EPIGENETICHE NELLE MATRICI BIOLOGICHE	44
4.1.1 Cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC)	44
4.1.2 HPLC-MS/MS	46
4.1.3 Spettrometria di massa	47
<b>CAPITOLO V - PARTE SPERIMENTALE</b>	49
5.1 PARTE SPERIMENTALE	50
5.2 Matrice biologica	51
5.3 RACCOLTA E STOCCAGGIO DEL CAMPIONE	52
5.4 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE	53
5.5 SOSTANZE ANALIZZATE	55
5.6 CREATININA	61
5.7 DETERMINAZIONE DEGLI INDICATORI DI STRESS OSSIDATIVO E DI METILAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI URINARI MEDIANTE HPLC-MS/MS	61
5.8 DOSAGGIO DELLA CREATININA	66
5.9 ANALISI STATISTICHE	67
<b>CAPITOLO VI - RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	68
6.1 ANALISI SU MATRICE URINARIA	69
6.1.1 Differenze di sesso	70
6.2 ANALISI SU SALIVA – CARATTERISTICHE SOCIO-DEMOGRAFICHE	79
A) Gruppo I: 18 – 31 anni	80
B) Gruppo II: 34 – 44 anni	80
C) Gruppo III: 45 – 52 anni	81
D) Gruppo IV: 53 – 63 anni	82
6.3 ANALISI SU SALIVA - BIOMARKER	83
<b>CONCLUSIONI</b>	96
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	99

Al mio papà, a mia mamma e a Marcello: la mia famiglia

## INTRODUZIONE

Nel passato, scienze come la biologia molecolare attribuivano la patogenesi di alcune malattie ai cambiamenti delle sequenze dei nucleotidi, affermando che le mutazioni a livello dei geni fossero promotrici ed uniche responsabili nella conferma molecolare di qualsiasi patologia<sup>1,2,3</sup>.

Le scoperte scientifiche degli ultimi decenni hanno, però, rivelato il ruolo significativo di modificazioni del DNA che non comportano alterazioni del codice genetico e che costituiscono l'epigenoma. Recentemente, infatti, sono stati identificati diversi processi epigenetici, tra cui acetilazioni e metilazioni o fosforilazioni istoniche - ed altri meccanismi che possono emergere col passare del tempo - in grado di provocare danni ossidativi e di metilazione agli acidi nucleici (ad esempio, alterazione dei meccanismi di riparazione ed espressione genica), e che sembrano predisporre a diverse patologie croniche, degenerative e/o neoplastiche<sup>3</sup>.

I processi epigenetici, i fenomeni di metilazione o di ossidazione ed i meccanismi che contribuiscono alla formazione di radicali liberi (anche detti ROS o sostanze reattive dell'ossigeno) sono naturali ed essenziali per molte funzioni di omeostasi cellulare e rientrano, dunque, nelle normali condizioni fisiologiche, fin dallo sviluppo fetale. Tuttavia, uno squilibrio dell'omeostasi a favore di reazioni di ossidazione e fasi di ipo/ipermetilazione, in concomitanza alla perdita di meccanismi antiossidanti, contribuisce alla patogenesi di alcune malattie. I ROS, ad esempio, sono coinvolti in vari processi come la crescita e proliferazione cellulare, apoptosi e differenziazione. Queste molecole altamente reattive ed instabili, si formano durante i normali processi metabolici infiammatori, o conseguentemente all'esposizione a radiazioni ionizzanti o agenti ossidanti, e sono distrutti, se presenti in eccesso<sup>4</sup>, da sistemi antiossidanti naturali enzimatici e non enzimatici (quali, ad esempio, superossido dismutasi, catalasi e glutazione perossidasi, acido ascorbico, glutazione, acido lipoico, tocoferolo, retinolo e coenzima Q10)<sup>4</sup>.

I ROS più coinvolti sono l'anione superossido ( $O_2^-$ ), il perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ) ed il radicale ossidrilico ( $\bullet OH$ ); quest'ultimo, essendo il più reattivo, è dunque il più pericoloso quando associato all'invecchiamento e alle patologie croniche età-correlate<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> DOBZHANSKY T. (1937) Genetics and the origin of species. Columbia U.P., New York.

<sup>2</sup> PROVINE W. B. (1971) The origins of theoretical population genetics. The University of Chicago Press, Chicago.

<sup>3</sup> JORDHEIM, L., DURANTEL, D., ZOULIM, F. et al. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov* 12, 447–464 (2013). <https://doi.org/10.1038/nrd4010>.

<sup>4</sup> DABROWSKA, 2012 Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin exp Med*, 26 (1); 155-156.

<sup>5</sup> BARBIERI, 2009 Valutazione del danno da stress ossidativo come indicatore di effetto biologico dell'esposizione professionale a xenobiotici. Università di Bologna.

Infatti, il radicale idrossile è considerato la prima sorgente di danno ossidativo e la sua interazione con le molecole di DNA può addirittura portare alla rottura a singolo o doppio filamento, così come a importanti alterazioni delle basi azotate.

Le interazioni dei ROS con gli acidi nucleici possono portare alla rottura dello scheletro strutturale e a modifiche chimiche delle basi azotate; lo squilibrio fra la produzione dei ROS e i meccanismi di difesa antiossidanti dell'organismo, a favore della reazioni di ossidazione, viene definito come *stress ossidativo*.

Lo stress ossidativo è stato associato alla patogenesi ed al peggioramento di varie malattie, legate principalmente all'età, tra cui infarti, patologie cardiovascolari (placche aterosclerotiche), malattie neurodegenerative, diabete e invecchiamento precoce<sup>6</sup>.

Sono essenzialmente tre le macromolecole cellulari che possono subire processi di stress ossidativo ed essere modificate tramite legami covalenti: lipidi, proteine e acidi nucleici. Il danno agli acidi nucleici è meno frequente rispetto a quello su proteine o lipidi, grazie ai meccanismi di difesa e riparo che garantiscono la protezione da quello che potrebbe essere un danno persistente e potenzialmente molto grave. I cambiamenti delle macromolecole e la loro successiva degradazione portano alla formazione di numerosi prodotti: basi ossidate provenienti dal DNA e dall'RNA, aldeidi derivanti dai processi di perossidazione lipidica, e amminoacidi ossidati (in particolar modo tirosina e fenilalanina) come conseguenza del danno proteico. Il danno ossidativo alle proteine può risultare in una loro modificazione strutturale e, quindi, nella conseguente degradazione proteolitica delle stesse come meccanismo difensivo. Gli effetti dei ROS sul DNA rivestono una fondamentale importanza in ambito biomedico in quanto possono generare errori di appaiamento di basi durante la replicazione, risultando potenzialmente mutageni. Tra le basi del DNA e dell'RNA, la guanina è quella più facilmente esposta all'attacco del ROS idrossile, in particolare in posizione 8, mentre la citosina viene metilata in posizione 5. Tali sostanze, escrete nelle urine in forma libera e coniugata (ad es. con ribosio o deossiribosio), sono gli indicatori biologici più di frequente associati allo stress ossidativo o ad anomalie nei processi della metilazione. Nello specifico, la guanina ossidata è un prodotto di eliminazione renale, ricercato come 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-oxo-dGuo) nelle matrici biologiche, ed è l'indicatore di danno ossidativo al DNA più studiato ad oggi. I valori di 8-oxo-dGuo determinati nelle urine correlano con la quota di danno subito dal DNA e riparato dai meccanismi di riparazione già esistenti. Altri prodotti comuni di ossidazione della guanina, facilmente determinabili con HPLC-MS/MS in urina, sono la 8-oxo-7,8-

---

<sup>6</sup> LL, W. (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*, 339 (1-2):1-9

diidroguanina (8-oxo-Gua) e l'8-oxo-Guanosina (8-oxo-Guo)<sup>7,8</sup>. Sono questi ultimi i biomarkers di ossidazione e riparazione dell'acido nucleico. Sebbene la discussione scientifica sulla quantificazione e sull'origine della 8-oxo-dGuo non sia ancora giunta ad una conclusione definitiva<sup>9</sup>, dalla letteratura troviamo conferme sull'origine della 8-oxo-Gua urinaria, sicuramente in parte, dal processo di glicosilasi (il processo è il BER e l'enzima coinvolto è l'hOGG1), ovvero dall'attività del sistema di riparazione di escissione delle basi sui residui di guanina ossidata del DNA. L'8-oxo-Guo, invece, ha origine dalla guanina ossidata dell'RNA, anche se non è ancora noto se esistano dei meccanismi specifici di riparo dell'RNA, o se la sua presenza nelle urine sia da attribuire al normale turn over dell'RNA stesso<sup>10</sup>. Oltre a tutto ciò, negli ultimi anni gli studi su uomo si sono concentrati in ambito traumatologico e, in particolare, sui traumi fisici e psichici che sembra possano causare complesse alterazioni dell'omeostasi cellulare in grado di destrutturare il genoma, provocando un silenziamento o la trascrizione di diversi locus genici. Per ogni trauma sono stati investigati differenti percorsi biochimici, come ad esempio le alterazioni a carico di enzimi (DNA metiltransferasi, istone acetiltransferasi), oppure direttamente i geni coinvolti nel metabolismo e nei recettori della serotonina, del cortisolo e degli ormoni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. È stato quindi ipotizzato che, a prescindere dal meccanismo con cui questi eventi si instaurano, lo sviluppo di fenotipi più stressati sia alla base della patogenesi di alcuni disturbi del comportamento e, poiché queste modifiche sono irreversibili, nascono varie possibilità di ricerca su come trattare determinate patologie<sup>11,12</sup>.

Degna di nota appare la concezione che il trauma, di qualsiasi natura a livello del DNA, possa essere trasmesso ereditariamente, promuovendo la possibilità che esso venga subito anche dalle generazioni future; ad esempio, è stato verificato che alcune delle risposte a questi meccanismi di stress indotti dai traumi possano essere la tossicomania, i comportamenti aggressivi e i disturbi del comportamento in generale, nonché i suicidi, che si manifestano tipicamente in soggetti con una

<sup>7</sup> Joseph LUNEC, Karen A. HOLLOWAY, Marcus S. COOKE, Steve FAUX, Helen R. GRIFFITHS, Mark D. EVANS, Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? 1 This article is part of a series of reviews on "Oxidative DNA Damage and Repair." *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 33, Issue 7, 2002, Pages 875-885, ISSN 0891-5849, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00882-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00882-1).

<sup>8</sup> Marcus S. COOKE, Lars BARREGARD, Vilas MISTRY, Neelam POTDAR, Rafal ROZALSKI, Daniel GACKOWSKI, Agnieszka SIOMEK, Marek FOKSINSKI, Peter SVOBODA, Hiroshi KASAI, Justin C. KONJE, Gerd SALLSTEN, Mark D. EVANS & Ryszard OLINSKI, (2009) Interlaboratory comparison of methodologies for the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, *Biomarkers*, 14:2, 103-110

<sup>9</sup> Marcus S. COOKE, Tiago L. DUARTE, Deborah COOPER, Jie CHEN, Sridevi NANDAGOPAL, Mark D. EVANS, Combination of azathioprine and UVA irradiation is a major source of cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, *DNA Repair*, Volume 7, Issue 12, 2008, Pages 1982-1989, ISSN 1568-7864, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.08.007>.

<sup>10</sup> George PERRY, Arun K. RAINA, Akihiko NUNOMURA, Takafumi WATAYA, Lawrence M. SAYRE, Mark A. SMITH, How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 28, Issue 5, 2000, Pages 831-834, ISSN 0891-5849, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00158-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00158-1).

<sup>11</sup> WILSON S., JONES L., COUSEENS C., et al, The Links Between Environmental Factors, Genetics, and the Development of Cancer, in *Cancer and the Environment: Gene-Environment Interaction*, (2002).

<sup>12</sup> LANGE S., GALLAGHER M., KHOLIA S. et al, Peptidylarginine Deiminases-Roles in Cancer and Neurodegeneration and Possible Avenues for Therapeutic Intervention via Modulation of Exosome and Microvesicle (EMV) Release?, in *Int J Mol Sci.* (2017); 18(6): 1196.

particolare “predisposizione”. È in questa direzione che il DNA diventa, perciò, protagonista di tutte le nostre azioni, tanto da pensare che condizioni gli individui e addirittura le condotte illegali poste da tali soggetti “predisposti”, giustificandole<sup>13,14</sup>.

Numerose ed importanti funzioni cellulari fisiologiche dipendono dalla metilazione del DNA come ad esempio l'inattivazione dei cromosomi, la stabilità dell'intero genoma e del suo imprinting (l'*imprinting* è una regolazione epigenetica del dosaggio genico ed è mantenuto in parte da regioni diversamente metilate e riprogrammate normalmente nella linea germinale), ma anche i processi che conducono all'invecchiamento.

La metilazione è dunque processo che consiste nella modificazione covalente del DNA, in cui enzimi come la DNA-5metiltransferasi trasferiscono un gruppo metile (-CH<sub>3</sub>) da S-adenosilmetionina alla posizione C5 di citosina. La metilazione del DNA avviene solitamente ai CpG nucleotidi con un ruolo importante nell'espressione genica e silenziamento di elementi ripetuti.

L'attivazione o l'inattivazione di specifici geni viene determinata a seconda dei pattern genomici connessi a ipometilazione o iper-metilazione di cui sono reponsabili geni oncosoppressori, proto-oncogeni e altri geni coinvolti nella riparazione del DNA. I processi di riparazione del DNA dal “danno subito” vengono ampiamente influenzati dalle abitudini di vita, dalla dieta, dall'invecchiamento e anche dai traumi o dallo stress conseguente ad essi.

In generale, l'ipermetilazione sembra portare all'inibizione dell'espressione genica a livello trascrizionale provocando un silenziamento genico, mentre l'ipometilazione sembra essere associata ad una funzione genomica alterata e stabilità cromosomica ridotta.

Dunque, le principali funzioni dei processi di metilazione sono collegate alla repressione della trascrizione:

- a) difesa contro i trasposoni: la metilazione è fondamentale per mantenere silenti i genomi dei trasposoni e dei retrotrasposoni;
- b) regolazione genica: la metilazione contribuisce a stabilire e mantenere uno stato trascrizionalmente inattivo (eterocromatina).

Nasce così l'interesse precipuo e l'importanza sempre più urgente dell'identificazione di biomarkers dello stress ossidativo e di metilazione che siano patognomnici di una data esposizione al trauma e che espongono l'individuo al rischio di sviluppare un determinato comportamento. Le ipotesi

<sup>13</sup> ROBINSON G. E., FERNALD R. D., CLAYTON D. F., Genes and Social Behavior, in Science.(2008); 322(5903): 896–900.

<sup>14</sup> BIELAWSKI T., MISIAK B., MOUSTAFA A., FRYDECKA D., Epigenetic mechanisms, trauma and psychopathology: targeting for chromatin remodeling complexes, in Nature Reviews Neuroscience (2019) 30 (6): 595-604.

fin qui discusse fanno presupporre che i traumi e lo stress possano essere identificati in primis con un approccio anamnestico, e poi con studi di secondo livello che caratterizzano il danno organico sul DNA tramite analisi strumentale su matrici biologiche

Come vedremo, secondo la letteratura scientifica i danni ossidativi e di metilazione si verificano a carico degli acidi nucleici anche in seguito all'esposizione a xenobiotici, e questo predisporrebbe ad una serie di patologie come cancro, malattie cardiovascolari, diabete, etc.

Non sono tuttora molti gli studi che abbiano investigato gli effetti delle sostanze d'abuso delle reazioni epigenetiche, potendosi ipotizzare che la fragilità verso le dipendenze possa essere correlata a traumi, da ricercare in anamnesi, e che questi abbiano determinato alterazioni epigenetiche che, come risultato, inducono il soggetto a ricercare le sostanze d'abuso. Al contrario, potrebbe essere l'uso stesso di sostanze a dare il via ad una cascata epigenetica documentabile.

Entrambe le ipotesi, qualora avvalorate, avrebbero importanti ripercussioni in ambito medico-legale e psichiatrico forense.

Il presente studio ha, pertanto, come obiettivo la valutazione della correlazione tra uso di sostanze psicoattive e indicatori di metilazione del DNA e danno ossidativo agli acidi nucleici in una popolazione in terapia con metadone, sottoposta a stress sostanza-correlato, in due differenti matrici: urina e saliva.

L'eventuale riscontro di un fenomeno epigenetico indice di uso di sostanze psicoattive aprirebbe uno scenario del tutto nuovo e promettente in termini di markers di *evidence* con risvolti giuridici e medico-legali rilevanti.

Va da sé che quanto appena affermato può realizzarsi soltanto in un futuro non immediato, data la recente scoperta dei suddetti biomarkers legati a processi di metilazione. La loro interpretazione biologica può, infatti, essere associata ad iper- o ipo-metilazione, ma sono certamente necessari studi futuri approfonditi che diano significato a tali indicatori e alle loro concentrazioni e che chiariscano i meccanismi biologici implicati. Questo studio vuole, pertanto, rappresentare uno dei primi tasselli che andranno a pavimentare la strada verso quella che potremmo definire come l'*epigenetica forense*.



## CAPITOLO I – L'epigenetica

## 1.1 L'EPIGENETICA

L'epigenetica è una delle più recenti branche della genetica e viene anche definita come l'arte di leggere e interpretare le informazioni contenute nel DNA: essa studia i cambiamenti ereditabili dell'espressione genica non ascrivibili ad alterazioni della sequenza nucleotidica e si incentra sulle trasformazioni fenotipiche, senza alterazione del genotipo.

Il termine *epigenetica* deriva dal greco “ἐπι, epì” “*sopra, in aggiunta*” e “γενετικός, gennetikòs” “*relativo all'eredità familiare*”, ed è stato coniato nel 1942 da Waddington (1905-1975). Waddington prendeva le distanze dal modello di DNA, proposto allora da Monod, concepito come invariante fondamentale e portatore del programma di costituzione di un organismo, attribuendogli piuttosto il ruolo chiave di scrigno di informazioni e strumenti, che sarebbero state poi rielaborate, una volta che la cellula fosse stata inserita in specifiche condizioni ambientali <sup>15</sup>.

La genomica è invece la disciplina che studia tutto il genoma, ovvero l'assetto dei geni e le loro interazioni. Il genoma, infatti, rappresenta, nella sua completezza, l'informazione trasmissibile, scritta sotto forma di acidi nucleici. Il genoma umano è formato da circa 3 miliardi di paia di basi di DNA, contenenti a loro volta 20.000 geni codificanti per proteine.

Un segmento di DNA contiene le informazioni necessarie per la sintesi di un prodotto biologico funzionale, come una proteina o un RNA, e tale segmento prende il nome di gene.

In particolare, il DNA o acido desossiribonucleico è una molecola ad alto peso molecolare nella quale è racchiusa tutta la nostra informazione genetica<sup>16</sup>. La molecola di DNA è composta da due filamenti avvolti a spirale l'uno intorno all'altro e i nucleotidi che li costituiscono sono formati da tre componenti: il desossiribosio, una delle quattro basi azotate (adenina (A), guanina (G), citosina (C) o timina (T)) ed infine un gruppo fosfato (P) che forma l'impalcatura della catena con lo zucchero.

Le basi azotate rimangono al centro della doppia elica e tramite legami idrogeno, contribuiscono a mantenere appaiati i filamenti, con appaiamenti specifici (A-T e C-G), protetti da uno scheletro di zuccheri e gruppi fosfato. La struttura primaria del DNA rappresenta questa specifica sequenza dei nucleotidi e costituisce la base del codice genetico.

L'RNA o acido ribonucleico realizza la sintesi proteica a partire dal DNA e durante questa traduzione, mentre per C, G e T viene rispettato l'appaiamento così come nella struttura del doppio filamento del DNA, per ogni A viene, invece, tradotto un uracile U, la base azotata che nell'RNA messaggero (mRNA) fa le veci della timina<sup>17</sup>. Uno dei compiti degli mRNA è quello di trasferire l'informazione genetica dal

<sup>15</sup> TRONICK E., HUNTER R.G., Waddington, Dynamic Systems, and Epigenetics. *Front Behav. Neuroscience*. 2016 Jun 10;10:107. doi: 10.3389/fnbeh.2016.00107. PMID: 27375447; PMCID: PMC4901045.

<sup>16</sup> NELSON D. L., COX M M, *I Principi di Biochimica di Lehninger* (2014).

<sup>17</sup> NELSON (2014) Random-Primed, Phi29 DNA Polymerase-Based Whole Genome Amplification. *Current Protocols in Molecular Biology*.

DNA alle proteine di nuova sintesi nel citoplasma cellulare e ogni alterazione di questa sequenza determina una conseguenza più o meno rilevante sulla proteina finale.

Nel corso della nostra vita, intra- o extrauterina che sia, il DNA va incontro a diverse trasformazioni, sia a livello della sequenza nucleotidica (in caso di mutazione genica o puntiforme) e che possono esitare in una variazione genotipica, sia a modificazioni strutturali del genoma che esitano in una variazione fenotipica. Le mutazioni geniche possono però anche portare a variazioni del fenotipo, a seconda della natura della modifica; allo stesso modo, anche le modificazioni strutturali possono portare a variazioni genotipiche (vedasi delezioni, inversioni o le duplicazioni di tratti estesi di cromosomi).

Dette mutazioni rappresentano dei cambiamenti ereditabili di generazione in generazione e generalmente insorgono in modo spontaneo, ma possono anche essere la risultanza di agenti chimici o fisici, reazioni che possono dare luogo ad un processo patologico<sup>18</sup>.

La branca della genetica che studia come l'ambiente possa condizionare l'espressione dei caratteri contenuti nei geni è l'epigenetica. Le ricerche in questo campo hanno indicato quanto l'ambiente influisca di fatto sullo sviluppo di un organismo vivente.

## 1.2 LE TRASFORMAZIONI EPIGENETICHE

L'epigenetica studia l'insieme di quegli eventi che comportano cambiamenti a livello del DNA, regolando l'espressione genica indipendentemente dalla sequenza nucleotidica; tali modifiche determinano solo cambiamenti funzionali, non genetici o strutturali, del genoma.

Se il genoma coincide con il DNA, l'epigenoma, anche come dettato dall'etimologia, è ciò che si trova "sopra, al di là" del DNA. Sono state molte le metafore utilizzate per spiegarne la differenza: Jenuwein, ad esempio, ha paragonato il genoma e l'epigenoma rispettivamente ad un libro stampato o letto, dove le parole scritte (il DNA) sono sempre le medesime, ma la lettura di un testo può avere diverse interpretazioni.

Alcune delle proprietà indispensabili dell'epigenoma sono:

- conservazione dell'informazione genetica;
- reversibilità;
- ereditabilità (memoria epigenetica);
- plasticità (capacità di creare cellule diverse dalla cellula d'origine).

Nel nucleo il DNA, per sopperire alla sua lunghezza pari a circa due metri, costituisce, insieme con le proteine istoniche, una struttura complessa chiamata cromatina. Il DNA così stipato ed assemblato all'interno di ogni cellula riesce a compattare il suo nucleo a circa 10 µm di diametro.

<sup>18</sup> WILSON S., JONES L., COUSEENS C., et al, The Links Between Environmental Factors, Genetics, and the Development of Cancer, in *Cancer and the Environment: Gene-Environment Interaction*, (2002).

Le modificazioni epigenetiche sono coinvolte nella regolazione della struttura della cromatina e controllano l'espressione genica senza alterarne la sequenza. Queste reazioni possono essere suddivise in 3 gruppi: metilazione del DNA, modificazioni post-trasduzionali degli istoni e alterazioni di piccole molecole di RNA non codificante<sup>19</sup>. Le modificazioni epigenetiche interessano, a livello della cromatina, l'acetilazione e la deacetilazione degli istoni e, a livello del DNA, la metilazione della citosina.

Uno dei possibili obiettivi delle modificazioni epigenetiche potrebbe essere il silenziamento genico, una funzione regolatoria indispensabile durante il ciclo vitale della cellula, ma potrebbe anche caratterizzare l'attivazione di fattori di trascrizione per l'espressione genica.

Esistono anche altri meccanismi che, espressi in maniera anomala/aberrante, sono responsabili di inneschi biochimici anomali. Per citarne alcuni: l'imprinting genomico, il rimodellamento della cromatina, il microRNA (RNA non codificante) ed infine elementi cromosomici non istonici.

### 1.3 LA METILAZIONE

Il primo livello di mutamento epigenetico è la metilazione: tale fenomeno è stato osservato per la prima volta nel 1925 nel Bacillo tubercolare, successivamente nel 1948 nel timo di vitello, ma solo nel 1975 è stato dimostrato il suo ruolo biologico nell'espressione genica<sup>20</sup>.

La metilazione del DNA è un meccanismo epigenetico che consiste nel legame covalente di un gruppo metile (addizione di un gruppo -CH<sub>3</sub>) da DNA metiltransferasi e SAM (donatore S-adenosilmetionina) al carbonio in posizione 5' dell'anello pirimidinico di una Citosina che precede una Guanina (isole CpG) con formazione di 5-Metilcitosina (5-MeCyto tramite *base flipping*)<sup>21</sup>.

Queste sequenze di basi ripetute (CpG) nel DNA genomico sono abbondanti in regioni con funzioni regolatorie e promotori di molti geni eucariotici, e rappresenta un importante meccanismo di controllo. Solitamente la metilazione del DNA a livello delle isole CpG causa la repressione della trascrizione o inibizione dell'espressione genica; questo processo è reversibile tramite noti meccanismi di demetilazione della stessa sequenza<sup>22</sup>. Come accennato, dalla metilazione del DNA dipendono un'ampia gamma di funzioni cellulari fisiologiche di vitale importanza come la stabilità del genoma, l'imprinting genomico, l'inattivazione del cromosoma X, la regolazione genica tessuto-specifica e l'invecchiamento.

<sup>19</sup> STEIN 2012, Hybridization Analysis of Histone Messenger RNA: Association with Polyribosomes During the Cell Cycle, Science Vol 189, Issue 4202•pp. 557-558

<sup>20</sup> Meng H, Cao Y, Qin J, et al. DNA methylation, its mediators and genome integrity. Int J Biol Sci. 2015;11(5):604-617. Published 2015 Apr 8. doi:10.7150/ijbs.11218

<sup>21</sup> XIADONG, 2001, Adomet-dependent methylation, dNA methyltransferases and base flipping. Nucleic Acids Research, Vol 29, 18, 3784-3795

<sup>22</sup> ZENG, H., QI, C.-B., LIU, T., XIAO, H.-M., CHENG, Q.-Y., JIANG, H.-P., FENG, Y.-Q. (2017). Formation and Determination of Endogenous Methylated Nucleotides in Mammals by Chemical Labeling Coupled with Mass Spectrometry Analysis. Analytical Chemistry, 89(7), 4153–4160. doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00052

In passato si credeva che il pattern dell'epigenoma si stabilizzasse nelle prime fasi dello sviluppo fetale, ma studi recenti affermano che esso cambia in risposta all'ambiente durante la vita dell'individuo. L'accensione o lo spegnimento di specifici geni viene, pertanto, determinata a seconda dei pattern di ipo- o iper-metilazione; tra questi figurano gli oncosoppressori, proto-oncogeni e geni coinvolti nei meccanismi di riparo del DNA. Questo processo è, in larga misura, influenzato dallo stile di vita, dalle abitudini alimentari, dall'invecchiamento e, secondo i recenti studi, anche dai traumi o dallo stress conseguente.

In realtà, secondo recenti studi, l'ipermetilazione sembra portare all'inibizione dell'espressione genica a livello trascrizionale provocando, dunque, un silenziamento genico. Di contro, l'ipometilazione è associata a una stabilità cromosomica ridotta e, dunque, ad una funzione genomica alterata<sup>23</sup>.

Una volta verificatesi le mutazioni, è importante sottolineare che la 5-MeCyto è molto instabile da un punto di vista chimico e, in presenza di agenti alchilanti, tende facilmente a perdere un gruppo aminico rispetto alla citosina tal quale. La deaminazione produce uracile, base azotata appartenente solo all'RNA e riconosciuta prontamente come estranea al DNA e, quindi, corretta dal sistema di riparazione<sup>24</sup>. Alterazioni dei normali profili di metilazione, causate da esposizioni ad agenti alchilanti, determinano instabilità del genoma e sono coinvolte nel processo della carcinogenesi<sup>25</sup>.

Il danno al DNA da ROS si verifica comunque con una frequenza minore rispetto a quello che colpisce proteine e lipidi.

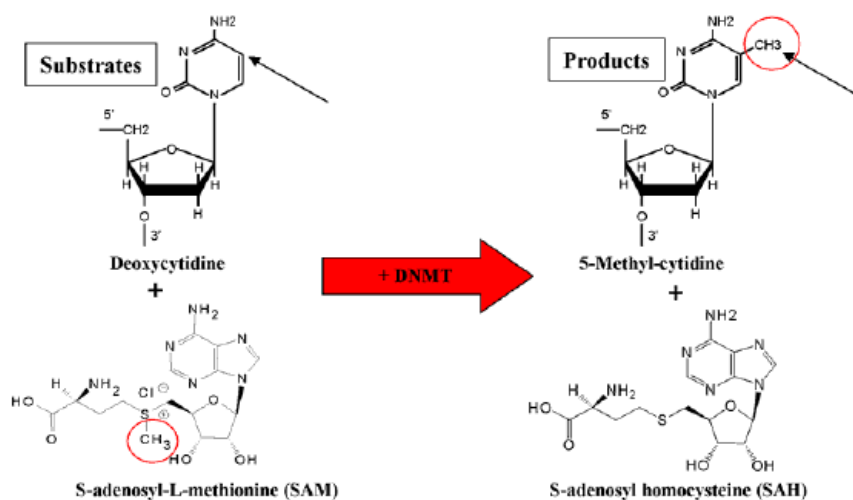


Figura 4: metilazione del DNA

<sup>23</sup> FUKS F., HURD P.J., DEPLUS R., KOUZARIDES T., The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 2003 May 1;31(9):2305-12. doi: 10.1093/nar/gkg332. PMID: 12711675; PMCID: PMC154218.

<sup>24</sup> CZAJA W., MAO P., SMERDON M.J., The emerging roles of ATP-dependent chromatin remodeling enzymes in nucleotide excision repair. *Int J Mol Sci.* 2012;13(9):11954-73. doi: 10.3390/ijms130911954. Epub 2012 Sep 20. PMID: 23109894; PMCID: PMC3472786.

<sup>25</sup> FOLEY, J.E., MAEDER, M.L., PEARLBERG, J., JOUNG, J.K., PETERSON, R.T., and YEY, J.R. (2009), Targeted mutagenesis in zebrafish using customized zinc-finger nucleases. *Nature Protocols.* 4(12):1855-1867.

La metilazione può avvenire anche a livello dell'RNA, ed in particolare dell'RNA messaggero, risultando quindi coinvolta nel controllo dell'espressione genica. Il processo (noto con il nome di *capping*) è una delle tappe di maturazione da pre-RNA a mRNA: esso consiste nell'aggiunta di un cappuccio di guanosina al residuo 5' terminale dell'acido nucleico con un legame 5'-5' trifosfato (G5'ppp5'X). La reazione successiva, catalizzata dall'enzima RNA-guanina7-metiltransferasi, consiste nell'aggiunta di un gruppo metilico in posizione N7 del capping di guanosina (cap 7-MeGuo). Il cap 7-MeGuo è essenziale per un'efficiente espressione genica e rende più stabile l'mRNA in quanto lo protegge dalla degradazione sia da parte di endonucleasi che di ribonucleasi. In Figura 4 è riportata la metilazione del DNA ad opera di enzimi DNMT.

## 1.4 IMPRINTING GENOMICO

L'imprinting genomico o genetico è un ulteriore meccanismo di regolazione della trascrizione epigenetica con un ruolo primario nella modulazione del materiale genetico delle cellule germinali: con esso si intende il fenomeno per cui uno dei due alleli di un gene è escluso in modo prettamente selettivo dall'attivazione, in dipendenza dal genitore da cui il cromosoma recante l'allele stesso è stato ricevuto (esclusione allelica paterna o materna). L'imprinting genomico permette, dunque, l'espressione dell'allele sano piuttosto che di quello codificante per una patologia. Questo meccanismo è garantito dagli enzimi coinvolti (le metilasi), i quali reprimono uno dei due alleli con un'iper-metilazione costituendo così una sorta di "impronta" selettiva.

## 1.5 DANNO OSSIDATIVO

Oltre alla metilazione, anche il danno ossidativo può avvenire a livello del DNA. La causa del danno al DNA può avvenire secondo due diverse teorie: la prima sostiene che esso sia il risultato di una reazione di Fenton sito-specifica come illustrato di seguito (Figura 1)

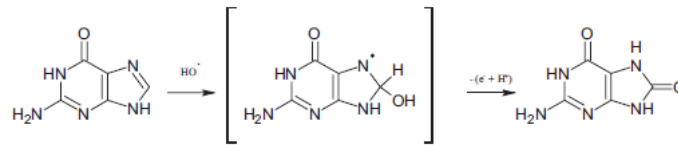


Figura 1: Reazione di Fenton

Un'altra teoria afferma che l'effetto dello stress ossidativo aumenti la concentrazione intracellulare di ioni calcio, attivando nucleasi che digeriscono il DNA.

Esistono, inoltre, due diversi possibili meccanismi dibattuti secondo cui il radicale  $\text{OH}^\bullet$  attacchi la guanina:

1) l'addotto  $\text{OH}^\cdot$ /guanina si forma spontaneamente (Figura 2):

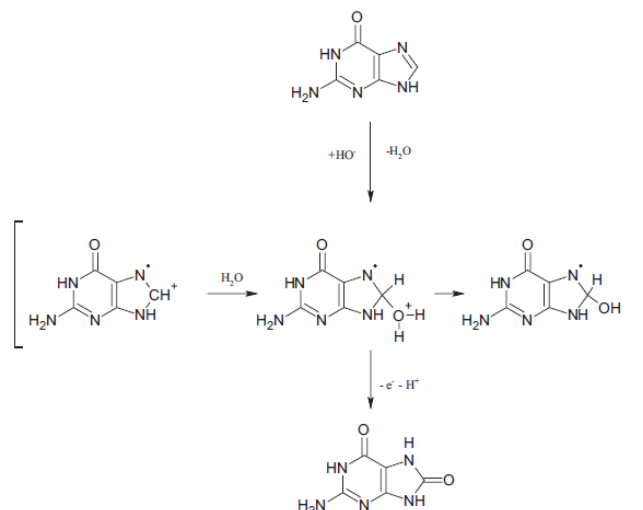


**Figura 2:** Prima teoria del meccanismo di attacco del radicale  $\text{OH}^\cdot$  alla guanina

2) il secondo meccanismo prevede invece due passaggi (Figura 3):

-nel primo intermedio di reazione un elettrone viene estratto dalla molecola della guanina;

-nel secondo step si forma il prodotto finale:



**Figura 3:** teoria del meccanismo di attacco del radicale  $\text{OH}^\cdot$  alla guanina

Come evidenziato, l'epigenoma è influenzato da molteplici fattori, tra questi: età, alcol, fumo di sigaretta, chemioterapici, interferenti endocrini (dietilstilbestrolo, bisfenolo A, genisteina), fungicidi (vinclozolina) e pesticidi (metossichlor), metalli pesanti (cromo, cadmio, arsenico,...), radiazioni ionizzanti ed ultraviolette.

## 1.6 ALTERAZIONI CHIMICHE NEGLI ISTONI

La cromatina è costituita da numerosi istoni avvolti da filamenti di nucleotidi, le cui unità sono chiamate nucleosomi e contribuiscono alla compattazione del DNA. La conformazione della cromatina

è definita da una serie di modificazioni a carico delle code N-terminali degli istoni tra cui: acetilazione, deacetilazione, metilazione, fosforilazione e altre. Queste reazioni influiscono sulla struttura della cromatina facilitando la trascrizione di un gene, oppure la sua inibizione o altri meccanismi a cascata<sup>26</sup>.

Gli istoni sono strutture dinamiche soggette ad un gran numero di modifiche anche post-trasduzionali; la letteratura conferma l'esistenza di un vero e proprio codice istonico in grado di regolare l'espressione dei geni<sup>27</sup>.

La reazione di acetilazione sugli istoni rende il legame con i fattori di trascrizione più efficiente poiché rende la cromatina più accessibile.

Questa reazione è promossa da una classe di enzimi chiamata HATs (istone-acetiltransferasi) e prevede il trasferimento di un gruppo acetile (che proviene dall'acetil-coenzima A) generalmente sull'azoto della lisina; in questo modo non può legare i gruppi fosfato del DNA, a carica negativa. Il DNA viene quindi "allentato" in quel preciso punto, permettendo ad altre proteine o enzimi di interagire con esso ed intervenendo, quindi, nel processo di attivazione della trascrizione; a conferma della sua importanza, determinati coattivatori trascrizionali sembrano possedere un'attività di acetilazione istonica intrinseca<sup>28</sup>.

Alcuni tipi di HATs sono presenti in modo ubiquitario e acetilano gli istoni solo dopo stimoli cellulari. La loro attività è particolarmente elevata nelle cellule nervose, in quelle del midollo osseo ed in alcune strutture endocrine, ovvero in quelle linee cellulari in replicazione attiva o ad elevato metabolismo. Tra queste si annoverano le cellule tumorali; infatti, di recente, le HATs sono diventate un potenziale bersaglio della terapia contro i tumori<sup>29</sup>. Mentre l'acetilazione della lisina di H3 viene associata alla cromatina attiva nella trascrizione, le deacetilasi e le metiltransferasi istoniche fermano la trascrizione, condensando la cromatina.

Gli effetti, a seconda della reazione, possono essere completamente diversi e con varie conseguenze: la metilazione di un residuo di lisina 9 sull'istone H3 porta alla formazione di un sito di legame per la proteina principale dell'eterocromatina, l'eterochromatin protein-1 (HP1), una proteina in grado di indurre impacchettamento e, quindi, il silenziamento; viceversa, una metilazione di lisina 4 sull'istone H3 ha l'effetto opposto, promuovendo l'apertura cromatinica e conseguente aumento dell'espressione genica.

<sup>26</sup> SETO E., YOSHIDA M., Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes, in *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2014); 6(4).

<sup>27</sup> SHAABAN S. A., BEDFORD M. T., Reprogramming the histone code (2007), in *Chemistry & Biology* 14: 242-244.

<sup>28</sup> KAWASAKI H., SCHILTZ L., CHIU R., ITAKURA K., TAIRA K., NAKATANI Y., YOKOYAMA K. K., ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation, in *Nature* (2000); 405(6783):195-200.

<sup>29</sup> SCHNEIDER A., CHATTERJEE S., BOUSIGES O., SELVI B. R., SWAMINATHAN A., CASSEL R., BLANC F., KUNDU T. K., BOUTILLIER A. L., Acetyltransferases (HATs) as targets for neurological therapeutics, in *Neurotherapeutics*. 2013 Oct; 10(4):568-88.



La fosforilazione degli istoni avviene invece nelle regioni N-terminali di serina, treonina e tirosina e più specificatamente in H2A, H2B, H3 e H4; questa reazione è stata associata alla formazione dei cromosomi metafasici. Studi della recente letteratura hanno però dimostrato che la fosforilazione degli istoni, e in particolare sull'istone H3, è un fenomeno molto più ampio e complesso di quanto ipotizzato<sup>30</sup>.

## 1.7 RIMODELLATORI DELLA CROMATINA

I rimodellatori della cromatina sono una famiglia di enzimi che influenzano a vario titolo i complessi meccanismi nucleari che intervengono nelle funzioni vitali della cellula, regolando l'accesso alla cromatina e rispettando un preciso equilibrio sito-specifico, con determinate tempistiche<sup>31</sup>.

La prima famiglia è composta da modificatori che agiscono tramite legami covalenti, mentre la seconda famiglia è composta da modellatori ATP-dipendenti<sup>32</sup>.

I primi sono generalmente complessi multiproteici che modificano covalentemente le proteine istoniche, solitamente sulle code N-terminali: essi sono riconosciuti da altre proteine che modulano l'accessibilità della cromatina in base al tipo ed alla complessità delle modifiche stesse.

I modificatori covalenti imprimono una sorta di codice sulla sequenza primaria del DNA che, interpretato da altre proteine regolative nucleari, ne modula la funzione, regolandone quindi l'accessibilità.

I modificatori ATP-dipendenti utilizzano, invece, l'energia di idrolisi dell'ATP per alterare la cromatina direttamente nella sua conformazione, agendo sul posizionamento relativo dell'ottamero istonico sul filamento di DNA<sup>33</sup>.

Generalmente i modificatori ATP-dipendenti possono essere a loro volta ripartiti in due sottofamiglie: quelli che aprono la struttura cromatinica (attivatori trascrizionali), o quelli che compattano la struttura cromatinica (repressori trascrizionali)<sup>34</sup>.

## 1.8 RNA NON CODIFICANTE

Le proteine rappresentano il prodotto finale della traduzione del DNA, grazie ad un meccanismo intermedio obbligato rappresentato dall'mRNA, il filamento responsabile della vera e propria sintesi proteica.

A differenza dell'mRNA, l'RNA non codificante (anche detto microRNA, ncRNA o miRNA) è un trascritto genico che non produce proteine, ma allo stesso modo può esplicare funzioni regolatorie,

<sup>30</sup> SAWICKA A., SEISER C., Histone H3 phosphorylation – A versatile chromatin modification for different occasions, in *Biochimie* (2012); 94(11): 2193–2201.

<sup>31</sup> TYAGI M., IMAM N., VERMA K., PATEL A. K., Chromatin remodelers: We are the drivers!!, in *Nucleus* (2016);7(4):388–404.

<sup>32</sup> NARLIKAR G. J., SUNDARAMOORTHY R., OWEN-HUGHES, Mechanisms and Functions of ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Enzymes, in *Cell* (2013); 154(3): 490–503.

<sup>33</sup> BECKER P. B., HORZ W., ATP-Dependent Nucleosome Remodeling, *Annual Review of Biochemistry* (2002) 71: 247-273.

<sup>34</sup> MAZINA M. Y., VOROBYEVA N. E., The role of ATP-dependent chromatin remodeling complexes in regulation of genetic processes, in *Genetika* (2016);52 (5):529-40.

partendo da diversi meccanismi di destabilizzazione dei ribosomi fino ad arrivare a delle vere e proprie sezioni dell'mRNA codificante, che ha come effetto finale il silenziamento trascrizionale, agendo sulla cromatina e rimodellandola in senso repressivo<sup>35</sup>.

I microRNA aderiscono con pochi nucleotidi all'RNA bersaglio, determinando un taglio e rimuovendo la lunga sequenza di nucleotidi di adenina che protegge la parte terminale 3' delle molecole di mRNA, mediante de-adenilazione (processo di degradazione degli esosomi).

## 1.9 INDICATORI DI STRESS OSSIDATIVO E DI METILAZIONE AGLI ACIDI NUCLEICI IN URINA

Lo stress ossidativo induce diversi cambiamenti dal punto di vista metabolico nelle cellule; tra questi si annoverano:

- la diminuzione di ATP nelle cellule per danno ai mitocondri (meccanismo di disattivazione della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, con conseguente inibizione della glicolisi e aumento del catabolismo delle adenine);
- aumento della concentrazione citoplasmatica di calcio;
- depolarizzazione delle membrane cellulari (a causa di disattivazione dei canali potassio, calcio e sodio con aumento di permeabilità);
- diminuzione dei livelli di glutazione e riduzioni del rapporto glutazione ridotto / glutazione ossidato)<sup>36</sup>.

Al fine di riparare e/o eliminare le lesioni si attiveranno tutti quei sistemi di risposta al danno di DNA e, se questi non saranno sufficienti, si può arrivare all'apoptosi.

I diversi meccanismi con i quali gli errori di metilazione e di danno ossidativo al DNA possono essere identificati e rimossi enzimaticamente sono essenzialmente tre<sup>37</sup>:

- a) *Base Excision Repair* (BER) che consiste nella rimozione del danno mediante l'enzima N-glicosilasi 1, specifico riparare il DNA sulla posizione 8 della guanina ossidata;
- b) *Nucleotide Excision Repair* (NER) che elimina brevi segmenti di filamento contenenti l'oligonucleotide danneggiato;

<sup>35</sup> HU W., COLLER J., What comes first: translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function, in *Cell Res* (2012); 22(9): 1322-1324.

<sup>36</sup> DĄBROWSKA N., W. A. (2012). Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin Exp Med*, 26(1), 155-166.

<sup>37</sup> HU C W., Liu H H., L. J. et al. (2012). Direct Analysis of 5 Methylcytosine and 5 Methyl deoxycytidine in Human Urine by Isotope Dilution LC MS/MS: Correlations with N Methylated Purines and Oxidized DNA Lesions. *Chem. Res. Toxicol*, 25, 462-470.

c) idrolisi<sup>38,39,40,41,42</sup>.

I prodotti di riparazione, che costituiscono gli indicatori da caratterizzare, vengono rilasciati nel flusso sanguigno e poi eliminati nelle urine sia in forma libera che coniugati al deossiribosio. Misurare lo stato di stress ossidativo e i suoi effetti sta, quindi, divenendo sempre più una strategia per valutare la propensione allo sviluppo di varie malattie. Per questo motivo si cerca di identificare specifici marcatori biologici dello stress e danno ossidativo da ricercare in tessuti o fluidi facilmente analizzabili<sup>43,44</sup>.

Le caratteristiche di un biomarker, o indicatore biologico ideale, in campioni biologici dovrebbero essere le seguenti<sup>45</sup>:

- non deve essere soggetto ad alterazioni durante la manipolazione o la conservazione e risultare, inoltre, stabile nel tempo;
- deve essere coinvolto nello sviluppo della patologia patogenesi e deve avere un ruolo predittivo nello sviluppo della malattia;
- deve essere rilevabile nel campione indagato, o comunque nel tessuto che rifletta le modificazioni ossidative ad esso correlate;
- la sua concentrazione deve essere tale da poter essere quantificata con un metodo specifico, sensibile e riproducibile;
- non deve essere influenzato da fattori dietetici;
- deve essere facilmente misurabile nella popolazione e non soggetto a variabilità biologica.

## 1.10 EPIGENETICA E MEDICINA MOLECOLARE

Le neuroscienze cercano di individuare quali siano le basi biologiche dei disturbi, e capire quale sia la possibilità di ereditare dai propri discendenti un DNA “ad impronta criminale”, ad esempio, come ampiamente dimostrato nel disturbo antisociale di personalità; le scoperte più recenti hanno assegnato un ruolo chiave ai traumi e alle esperienze di vita, le quali imprimerebbero nel nostro codice genetico dei

38 Vairapandi, M., and Duker, N. J. (1993) Enzymic removal of 5- methylcytosine from DNA by a human DNA-glycosylase. *Nucleic Acids Res.* 21, 5323–5327.

39 Vairapandi, M., and Duker, N. J. (1996) Partial purification and characterization of human 5-methylcytosine-DNA glycosylase. *Oncogene* 13, 933–938.

40 Barreto, G., Schafer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S. K., Handa, V., Doderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., and Niehrs, C. (2007) Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445, 671–675.

41 Bhattacharya, S. K., Ramchandani, S., Cervoni, N., and Szyf, M. (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397, 579–583.

42 Zhu, J. K. (2009) Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* 43, 143–166.

<sup>43</sup> JACOB K.D. , Hooten N.N., TRZECIAK A.R. , EVANS M.K., Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. Volume 134, Issues 3–4, March–April 2013, Pages 139-157.

<sup>44</sup> HU C.W., LIU H.H., L. J. et al. (2012), Direct Analysis of 5 Methylcytosine and 5 Methyl deoxycytidine in Human Urine by Isotope Dilution LC MS/MS: Correlations with N Methylated Purines and Oxidized DNA Lesions. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 462-470.

<sup>45</sup> World Health Organization, Mental Health and Older Adults. Geneva: WHO (2013).

segni indelebili. In questa direzione, le conoscenze e pratiche mediche approfondiscono la medicina molecolare, per provare a fornire una spiegazione organica a qualsiasi patologia in corso.

Lo studio del comportamento è concentrato sul DNA sotto forma di basi genetiche ed epigenetiche e su alcuni dei biomarkers finora incontrati; i risultati ottenuti negli ultimi anni hanno un significato puramente orientativo e si rende necessario un contributo di studi più approfonditi, al fine di ottenere risvolti predittivi anche nell'ambito medico-legale.

In prospettiva, condurre un'analisi specifica su più indicatori genetici/epigenetici risulterebbe dunque un obbligo di partenza per le indagini, nel momento in cui l'autorità giudiziaria richieda degli approfondimenti diagnostici in merito.

Ad esempio, parlando di tossicodipendenza, un'analisi specifica ed affidabile su indicatori genomici di suscettibilità alla dipendenza da sostanze d'abuso e/o rischio di recidiva, metterebbe a disposizione dati statistici predittivi maggiormente attendibili e garantirebbe una migliore affidabilità nella valutazione complessiva del rischio di un soggetto di cadere in attitudini tossicomani, pur tenendo in considerazione le variabili socio-culturali ed individuali e i suoi valori di riferimento.

Sembra dunque possibile e di grande interesse identificare biomarkers o parametri genetici specifici ed univoci, correlabili all'abuso di sostanze xenobiotiche e calcolare, perciò, successivamente una probabilità statistica del rischio di sviluppo di un'attitudine tossicomane: è pur vero, però, che le caratteristiche individuali, la natura poligenica e multifattoriale del disordine, i meccanismi biologici di riparo e altre ulteriori possibili concause esistenti che portano a quella determinata modificazione epigenetica (ad esempio, la metilazione da tabagismo), rendono questo obiettivo più difficile da raggiungere.

In taluni casi, dimostrata la relazione causa-effetto fra tutte queste componenti, il soggetto potrebbe essere idoneo nel richiedere un risarcimento danni, qualora si stabilisse univocamente la responsabilità oggettiva dell'agente che ha causato il trauma.

A tal riguardo, hanno destato molto clamore gli studi sui sopravvissuti all'Olocausto ed i loro figli, per i disturbi ansiogeni e di insonnia che svilupparono maggiormente rispetto alla popolazione di controllo, tanto da poter adire a vie legali<sup>46</sup>, risultando infine destinatari di un risarcimento pecuniario.

La metilazione del DNA è già utilizzata in medicina forense per i seguenti scopi: rivelare la natura di un campione biologico, l'origine tissutale, l'età della persona, la distinzione del materiale genico tra gemelli monozigoti ed infine la possibilità di discriminare materiale genetico sintetizzato in vitro (distinguere tra DNA naturale e artificiale basato sull'analisi di metilazione di un insieme di loci genomici)<sup>47,48</sup>.

<sup>46</sup> SHARON A, LEVAV I, BRODSKY J, SHEMESH A A, Kohn R, Psychiatric disorders and other health dimensions among Holocaust survivors 6 decades later, *Br J Psychiatry* (2009); 195:331–35.

<sup>47</sup> FRUMKIN D, WASSERSTROM A, DAVIDSON A, GRAFIT A, Authentication of forensic DNA samples, in *Forensic Sci Int Genet.* (2010); 4 (2): 95-103.

<sup>48</sup> LEE Y, AN H, JUNGE, et al, Genome-wide methylation profiling and a multiplex construction for the identification of body fluids using epigenetic markers, in *Forensic Sci Int Genet* (2015); 17:17–24.

Le prove del DNA sono fondamentali in dibattimento giudiziario per la condanna o l'esonero di sospetti di vari tipi di crimine, dal furto allo stupro fino all'omicidio.

## 1.11 L'EPIGENETICA CLINICA COME BASE PATOLOGICA E BERSAGLIO TERAPEUTICO

L'epigenetica contribuisce allo sviluppo di numerose malattie multifattoriali, influenzando aspetti diversi della pratica medica, come la diagnosi o la progressione della malattia. Tutti i nostri apparati possono essere influenzati da aberrazioni epigenetiche che portano a manifestazioni di una malattia. Indubbiamente, la scoperta più rilevante da questo punto di vista è lo sviluppo di approcci epigenetici all'odierna terapia medica, e questo campo, un tempo limitato, si è ora esteso soprattutto ai bersagli principali: la metilazione del DNA e le modificazioni istoniche; gli RNA non codificanti e i modellatori della cromatina.

Sono principalmente due le categorie di farmaci che hanno come target l'epigenoma o i suoi enzimi, che agiscono sulla prevenzione degli insulti traumatici o sul trattamento degli stessi: i demetilanti (come l'azacitidina o la decitabina che agiscono sulle DMTs e gli inibitori delle istoni metiltransferasi HMT) e gli inibitori delle istoni deacetilasi (HDACI)<sup>49</sup>. Sebbene l'utilizzo di questi farmaci sia preferenziale in caso di neoplasie ematologiche di tipo pediatrico, tali farmaci condividono i target epigenetici dei traumi, lasciando immaginare presto un ampliamento della loro applicazione. Questi approcci vengono sviluppati per applicazioni in terapia combinata, come ad esempio la terapia del dolore, e potrebbero avere ruoli futuri nella medicina delle cellule staminali e rigenerativa.

Sono numerosi i campi di applicazione dei biomarker di stress ossidativo, spaziando dalla tossicologia clinica a quella occupazionale e ambientale. In tale direzione si è mosso anche uno studio di ricercatori<sup>50</sup> che ha previsto la determinazione dei valori di riferimento di specifici biomarcatori di esposizione ad inquinamento ambientale, di ossidazione e metilazione degli acidi nucleici nelle urine di una popolazione adulta (18-65 anni) di 224 soggetti composta da entrambi i sessi, occupazionalmente non esposti a fattori di rischio specifici e che non manifestavano malattie associate a ossidazione o metilazione degli acidi nucleici. Le associazioni tra indicatori di esposizione e gli indicatori di effetto sono state studiate utilizzando i livelli di concentrazione di inquinanti presenti negli ambienti di lavoro, quindi per livelli di concentrazioni più alti rispetto a quelli presenti in aria a cui tutti siamo comunemente esposti.

Nonostante si sia ben lontani dai livelli espositivi degli ambienti di lavoro, in questo studio sono riusciti comunque ad osservare associazioni tra indicatori di esposizione ad inquinanti ambientali ed

<sup>49</sup> LAWLOR E R, THIELE C J, Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets, in *Clinic Cancer Res* (2012) 15; 18 (10): 2768-2779.

<sup>50</sup> Lovreglio P, Stufano A, Andreoli R, Tomasi C, Cagnazzi P, Barbieri A, Soleo L, De Palma G. Urinary biomarkers of nucleic acid oxidation and methylation in workers exposed to low concentrations of benzene. *Toxicol Lett.* 2020 Oct 1;331:235-241. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.06.010. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32562636.

indicatori di effetto precoce come gli indicatori di esposizione e quelli di danno ossidativo e di metilazione degli acidi nucleici. In particolare, per la prima volta è stato possibile quantificare gli indicatori di metilazione escreti in forma libera nelle urine.

Inoltre, è stato possibile determinare<sup>51</sup> gli indicatori di danno ossidativo e di metilazione degli acidi nucleici in campioni di urina di bambini sani e in età scolare, per ottenere i valori di riferimento<sup>52</sup>. Per quanto riguarda le concentrazioni urinarie di tali indicatori, i livelli riscontrati in questo gruppo di bambini sono confrontabili con quelli che sono stati determinati in due studi precedenti e che hanno visto i bambini in età scolare residenti nella regione Lazio o in Sicilia, in prossimità di raffinerie, come casi studio<sup>53,54</sup>. Il confronto con uno studio effettuato su una popolazione di riferimento composta da adulti sani ha evidenziato che l'8-oxo-Gua nei bambini è presente a concentrazioni minori rispetto ai campioni degli adulti (circa di un terzo) e che le donne hanno concentrazioni urinarie di questo indicatore superiore agli uomini. 8-oxo-Guo e 8-oxo-dGuo risultano essere dello stesso ordine di grandezza in entrambe le popolazioni di riferimento. Una possibile spiegazione potrebbe essere che i bambini hanno l'organismo in via di sviluppo e non tutti i processi metabolici e/o i meccanismi fisiologici sono completamente sviluppati, formati e funzionanti. Gli indicatori di danno ossidativo e di metilazione correlano positivamente fra loro sia nei campioni della sera che nelle urine raccolte in mattinata, tranne la 5-MeCyt che non correla con 8-oxo-Gua e la 5-MedCyt che non correla con 1-MeGua; mentre la 5MedCyt mostra una debole correlazione negativa con 8-oxo-t6Gua, in tutti e due i tempi campionati.

<sup>51</sup> Andreoli R, Manini P, De Palma G, Alinovi R, Goldoni M, Niessen WM, Mutti A. Quantitative determination of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 8-oxo-7,8-dihydroguanosine, and their non-oxidized forms: daily concentration profile in healthy volunteers. *Biomarkers*. 2010 May;15(3):221-31. doi: 10.3109/13547500903434501. PMID: 19958079.

<sup>52</sup> Protano C, Astolfi ML, Canepari S, Andreoli R, Mutti A, Valeriani F, Romano Spica V, Antonucci A, Mattei V, Martellucci S, Vitali M. Exposure to individual and multiple carcinogenic metals during paediatric age: an experience from an Italian urban scenario. *Ann Ig*. 2017 Nov-Dec;29(6):494-503. doi: 10.7416/ai.2017.2180. PMID: 29048448.

<sup>53</sup> Andreoli R, Spataro G, Pignini D, Poli D, Banda I, Goldoni M, Riccelli MG, Petyx M, Protano C, Vitali M, Barbaro M, Mutti A. Urinary biomarkers of exposure and of oxidative damage in children exposed to low airborne concentrations of benzene. *Environ Res*. 2015 Oct;142:264-72. doi: 10.1016/j.envres.2015.07.003. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26186134.

<sup>54</sup> Andreoli R, Protano C, Manini P, De Palma G, Goldoni M, Petyx M, Rondinone BM, Vitali M, Mutti A. Association between environmental exposure to benzene and oxidative damage to nucleic acids in children. *Med Lav*. 2012 Sep-Oct;103(5):324-37. PMID: 23077793

## CAPITOLO II – Epigenetica, stress e traumi

## 2.1 STRESS ED EVENTI TRAUMATICI

Benché i traumi rappresentino una delle principali cause di morbilità e mortalità in tutto il mondo, una precisa ed univoca definizione risulta difficile.

A seconda che lo stress sia buono o cattivo, il cervello si rinnova e la sua struttura cambia per fare spazio a nuove esperienze e conoscenze o per gestire stimoli aggiuntivi che arrivano dall'esterno.

E' in quest'ottica che lo stress può essere definito come una risposta bio-psicofisica ad una forma di sollecitazione interna o esterna<sup>55</sup>.

Gli stimoli dunque portano il sistema nervoso centrale a reagire, tanto che, se questi stimoli vengono a mancare in condizioni estreme o molto singolari, ciò può portare a totale degenerazione delle funzioni cerebrali (come ad esempio nei casi di regressione da solitudine).

Le interazioni sociali sono essenziali per lo sviluppo della mente umana, sia in fase di sviluppo (dall'infanzia all'adolescenza) sia nell'età adulta, ma soprattutto nella vecchiaia, dove si acuisce il bisogno di attenzioni e di relazioni con l'altro.

Questa tipologia di stress (con accezione positiva) dovuto ai rapporti con l'esterno e con l'altro, non solo permette di sviluppare nuove forme di regolazione delle nostre emozioni, ma anche di sperimentare nuovi desideri e soprattutto nuove soluzioni e strategie per soddisfarli.

Qualora questi stimoli siano eccessivi oppure vengano totalmente a mancare, la mente reagisce, trasformando lo stress da adattativo a mal-adattivo, ed innescando, quindi, processi neurodegenerativi che possono esitare in condotte comportamentali errate.

Dall'incidente in auto alla testimonianza di eventi terribili, dall'abuso psicologico o sessuale agli eventi naturali catastrofici o alle guerre, le esperienze traumatiche comprendono numerosi eventi.

Subire tali eventi traumatici può aumentare i rischi per futuri eventi anche su altre persone e per trasferimento genetico alla prole e per meccanismi a cascata sulle persone vicine.

Gli impatti del trauma dipendono da numerose variabili come la vulnerabilità individuale, risorse e fattori protettivi epigenetici soggettivi, ed hanno effetti più intensi se verificatisi durante l'infanzia o durante la vita intrauterina.

Per tutti questi motivi una definizione univoca del "trauma" risulta complicata, poiché, per essere considerato tale, le sue ripercussioni devono avvenire anche a livello molecolare, ovvero quei cambiamenti che turbano l'omeostasi cellulare e innescano l'iter patologico<sup>52</sup>.

Le risposte ad uno stesso trauma possono essere diverse in base ai contesti che circondano i soggetti, al tipo di trauma e all'interazione tra i fattori sopracitati.

Più di frequente gli eventi traumatici determinano effetti sul genoma delle fasce di individui più vulnerabili predisposti geneticamente o che hanno già subito altri eventi stressanti.

<sup>55</sup> BUTLER G., Definitions of stress, in *Occas Pap R Coll Gen Pract.* (1993); (61): 1-5.



Non è ancora chiaro se l'epigenetica traduca il suo effetto sul genotipo già mutato o no, tuttavia essa rappresenta il *primum movens* per la destabilizzazione, alla base delle malattie multifattoriali.

Il trauma o l'evento esterno interferisce sui meccanismi intrinseci di regolazione, riuscendo ad interagire e a modificare il comportamento dei geni.

Queste ipotesi confermano, come riportato in questo studio<sup>56</sup>, che gli individui non sono predestinati o succubi di mutazioni nel patrimonio genetico, piuttosto è l'esperienza individuale a caratterizzare la funzionalità dei geni, riuscendo così a ritardare, mitigare e persino silenziare effetti potenzialmente patologici di una mutazione genetica.

La letteratura conferma che la metilazione delle isole CpG nello specifico gioca un ruolo fondamentale nelle alterazioni del fenotipo successive ad eventi traumatici.

Ad esempio, un evento traumatico di tipo psicologico con influenza sul fenotipo può portare a diverse psicopatologie; dal punto di vista molecolare, sembra che siano proprio i complessi di rimodellamento della cromatina ATP-dipendenti ad avere un ruolo primario nell'insorgenza di tali disturbi<sup>57</sup>.

Altri studi indicano che i complessi di rimodellamento della cromatina ATP-dipendenti svolgono un ruolo cruciale nello sviluppo e consolidamento della memoria, nello sviluppo neurologico e nell'eziologia del comportamento depressivo. Pertanto, l'attività di questi moderatori cromatinici è a stretto contatto con la fisiopatologia di alcune malattie a carico della psiche.

## 2.2 CLASSIFICAZIONE DEI TRAUMI

La classificazione corrente dei traumi correlata a mutazioni epigenomiche e l'insorgenza di malattie psichiche suddivide i traumi in tre diversi livelli<sup>58</sup>:

1. Developmental trauma o trascuratezza/trauma relazionale infantile: relazione disfunzionale tra madre e bambino in cui il genitore non riesce a cogliere in modo corretto i segnali del bambino;
2. Trascuratezza grave, maltrattamento, abuso (psicologico, verbale, fisico e/o sessuale);
3. Trauma dovuto ad esperienze di guerra, tortura o genocidio (trauma sociale massivo).

E' importante ricordare che la maggior parte delle persone subisce delle reazioni emotive transitorie che raramente si trasformano in un vero e proprio disturbo, anche se estremamente dolorose; solo alcuni individui risultano più sensibili di altri ad eventi stressanti e traumatici, aumentando perciò il rischio di sviluppare sintomi da Post Traumatic Stress Disorder (PTSD).

In passato sono stati riportati numerosi studi sulla metilazione del DNA a livello dell'epigenoma, basati sull'approccio gene-candidato.

<sup>56</sup> ROBINSON G. E., FERNALD R. D., CLAYTON D. F., Genes and Social Behavior, in Science.(2008); 322(5903): 896–900.

<sup>57</sup> BIELAWSKI T., MISIAK B., MOUSTAFA A., FRYDECKA D., Epigenetic mechanisms, trauma and psychopathology: targeting for chromatin remodeling complexes, in Nature Reviews Neuroscience (2019) 30 (6): 595-604

<sup>58</sup> Cfr. MUCCI C., Trauma e perdono, una prospettiva psicoanalitica intergenerazionale, in Raffaello Cortina Editore (2014).

I geni più coinvolti nello sviluppo del PTSD sono geni che codificano rispettivamente per *SLC6A4*, recettore serotoninergico, *BDNF*, fattore neurotrofico cerebrale, *FKB5* che interagisce con etero-complessi recettori corticoidi maturi, *NR3C1*, o *GR*, recettore per i glucocorticoidi insieme a quelli dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, poiché l'asse viene stimolato dallo stress e influenza a cascata una serie di differenti processi biologici<sup>59</sup>.

I segnali esterni (che siano essi stress o traumi) vengono interpretati ed elaborati nel cervello, a livello dell'amigdala, da cui origina poi una via segnalatoria all'ipotalamo: gli ormoni *CRH* e *ADH* vengono rilasciati dall'ipotalamo legandosi ai principali recettori deputati.

Questo processo attiva la trascrizione di propiomelanocortina promuovendo la secrezione di *ACTH*, che innesca il rilascio di glucocorticoidi nel torrente ematico. Il cortisolo infatti, interagendo col suo recettore, forma un complesso che viene endocitato nel nucleo, e attiva regioni promotrici di vari geni target, necessarie per la normale risposta fisiologica dell'organismo.

Le proteine Hsp90 e FKBP5, che hanno funzione inibitoria sul recettore per il cortisolo, modulano lo stesso, diminuendo perciò la disponibilità del recettore al cortisolo stesso.

Hsp90 è una proteina Heat Shock Protein che svolge un ruolo essenziale nel preservare l'integrità della cellula se esposta ad alte temperature e nella corretta funzione e ripiegamento di altre proteine. FKBP5 è invece una proteina coinvolta nel ripiegamento cellulare<sup>60</sup>.

L'indagine analitica che quantifica i segni epigenetici a livello del genoma (EWAS) ha come scopo l'identificazione e la quantificazione della metilazione al DNA nelle isole CpG e/o in altri loci. Negli ultimi anni, l'EWAS sta dando risultati incoraggianti per quanto riguarda tutti gli scenari correlabili ai traumi e, in particolare, per gli studi sul PTSD.

In uno studio epidemiologico<sup>61</sup> è stato valutato il livello di metilazione del DNA di oltre 14.000 geni (in popolazione di circa 100 persone con eventi traumatico di pari entità) tra individui affetti da PTSD rispetto alla popolazione di controllo.

Il numero di geni non metilati non mostrava differenze statisticamente significative nei gruppi, ma al contrario, c'era una differenza significativa rispetto al numero di geni unicamente metilati: questi geni sono coinvolti attivamente o passivamente nella trascrizione per enzimi come le DNA metiltransferasi. Alcuni studi riportano che anche lo stress da razzismo sia in grado di causare simili cambiamenti epigenetici: le persone che hanno subito discriminazioni razziali hanno più di un cambiamento

<sup>59</sup> BACHMANN A.W., SEDGLEY T L, JACKSON R.V., GIBSON J N, YOUNG R M, TORPY D J, Glucocorticoid receptor polymorphisms and post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* (2005) 30(3), 297–306

<sup>60</sup> SABBAGH J J, et al, Targeting the FKBP51/GR/Hsp90 Complex to Identify Functionally Relevant Treatments for Depression and PTSD, in *ACS Chem Biol.* (2018), 13 (8): 2288-2299

<sup>61</sup> UDDIN M., AIELLO A.E., WILDMAN D.E. et al., Epigenetic and immune function profiles associated with post-traumatic stress disorder, in *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2010), 107(20): 9470– 9475

epigenetico identificabile, tra cui la metilazione sui geni che colpiscono chi soffre di schizofrenia, il disturbo bipolare e l'asma rispetto alla popolazione generale<sup>62</sup>.

Per quanto attiene invece alle differenze di genere, ad oggi non sono stati ottenuti risultati definitivi: in generale, le donne sembrano più predisposte a sviluppare PTSD in seguito ad eventi traumatici, ma sono necessari ulteriori e più mirati studi.

I modelli epigenetici sono tessuto-specifici ed il cervello rappresenterebbe così il tessuto più appropriato per i disturbi che coinvolgono processi centrali, anche per studi post-mortem.

Questi studi non sono comunque esenti da limiti intrinseci, tra cui la poca conoscenza delle modificazioni tanatologiche post-mortem<sup>63</sup>, le modalità di conservazione del campione, o la mancanza di precisi dettagli del paziente (o delle cause della morte), come le informazioni sul trauma stesso e la diagnosi di altre condizioni.

## 2.3 EREDITARIETA' DEI TRAUMI

La trasmissione di tratti attraverso generazioni è stata attribuita all'eredità di informazioni genomiche tramandata alla prole dai genitori.

L'epigenetica, ovvero il segno tangibile delle influenze ambientali sul nostro DNA, è coinvolta perciò nella trasmissione verticale dello stress vissuto attraverso le generazioni, confermando la persistenza del trauma nel genoma: esso viene tramandato come alterazione di geni, con la possibilità di manifestarsi nel fenotipo.

Esistono due grandi categorie di effetti epigeneticamente mediati:

- a) uno con effetti già nella vita intrauterina (stress materno durante la gestazione) o nella vita post-natale, quando il bambino avverte i traumi trasmessi dai genitori;
- b) il secondo include cambiamenti epigenetici associati ad un trauma verificato nei genitori prima del concepimento, segno che i traumi possono influenzare la linea germinale<sup>64</sup>.

I diversi effetti del trauma materno e paterno possono essere spiegati da molti fattori, prendendo in considerazione ad esempio gli effetti epigenetici sesso-specifici in seguito all'esposizione al trauma e allo stadio di sviluppo dei genitori al momento di quella determinata esposizione.

<sup>62</sup> BARCELONA DE MENDOZA V, HUANG Y, CRUSTO C A, SUN Y V, TAYLOR J Y, Perceived Racial Discrimination and DNA Methylation Among African American Women in the InterGEN Study, in *Biol Res Nurs* (2018); 20(2): 145-152.

<sup>63</sup> FULLGRABE J, HAJJI N, JOSEPH B Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications, in *Cell death Differ* (2010); 17(8): 1238-43.

<sup>64</sup> YEHUDA R, LEHRNER A, Intergenerational transmission of trauma effects: putative role of epigenetic mechanisms, in *World Psychiatry* (2018); 17(3): 243-257

Uno studio ha preso in considerazione un gruppo di soggetti accomunati da un trauma nel proprio passato e l'eventuale presenza di modificazioni epigenetiche: individuati i singoli traumi e tracciate le similitudini, hanno potuto identificare quali microRNA fossero alterati<sup>65</sup>.

I risultati di questo studio hanno evidenziato che i traumi sono collegati a livello di due specifici miRNA (miR-449, miR-34) individuati nello sperma, espressi esclusivamente nella cellula germinale maschile. I soggetti, che avevano vissuto situazioni traumatizzanti particolarmente gravi e reiterate nel tempo, presentavano livelli 300 volte più bassi di questi due miRNA rispetto a chi aveva subito traumi minori<sup>66</sup>. Altri ricercatori hanno dimostrato, con studi su popolazione murina, che queste variazioni sono associate a disturbi cardiaci, ansia e a problemi nella socievolezza delle cavie per almeno tre generazioni, confermando che i cambiamenti epigenetici e lo stress sono resistenti, stabili ed ereditabili a tutti gli effetti<sup>67</sup>.

E' essenziale ricordare che mentre le modificazioni epigenetiche sono reversibili, quelle genetiche non lo sono poiché alterano le sequenze del DNA.

Un tipico esempio di trasmissione paterna è dato dai figli di sopravvissuti a trauma di guerra come la guerra civile americana<sup>68</sup> che svilupperebbero PTSD in relazione agli anni di prigionia del genitore.

Anche le esposizioni materne ad infezioni o stress psicologico o a lutti nel periodo gestazionale sono collegati a problemi di salute nei bambini e negli adulti<sup>69</sup>.

Studi recenti suggeriscono che i meccanismi epigenetici sono in grado di mediare questa trasmissione come ad esempio la trasmissione comportamentale *post-partum* dalle madri alla stessa prole femminile.

I responsabili neuroendocrini e molecolari di questa trasmissione sono stati identificati tramite studi su ratti e coinvolgono interazioni ormonali (ad es. estrogeno-ossitocina), nonché differenti livelli di metilazione nei recettori ipotalamici degli estrogeni.

Le prove scientifiche e i meccanismi alla base di questa trasmissione generazionale sono ancora oggi oggetto di studio, così come le conseguenze ed effetti sullo sviluppo della prole e per la trasmissione ad essa di informazioni ambientali dai genitori. Ma è evidente che gli effetti materni possono influenzare molteplici aspetti della neurobiologia e del comportamento dei propri figli e questa particolare modalità

<sup>65</sup> LOPEZP, CASTRO A, FLOREZ M, MIRANDA K, ARANDA P, SANCHEZ-GONZALEZ C, LLOPIS J, ARREDONDO M, miR-155 and miR-122 Expression of Spermatozoa in Obese Subjects, in *Front Genet* (2018); 9: 175

<sup>66</sup> DICKSON D A, PAULUS J K, MENSAH V, LEM J, SAAVEDRA-RODRIGUEZ L, GENTRY A, PAGIDAS K, FEIG L A, Reduced levels of miRNAs 449 and 34 in sperm of mice and men exposed to early life stress, in *Transl Psychiatry* (2018); 8(1): 101.

<sup>67</sup> DICKSON D A, PAULUS J K, MENSAH V, LEM J, SAAVEDRA-RODRIGUEZ L, GENTRY A, PAGIDAS K, FEIG L A, Reduced levels of miRNAs 449 and 34 in sperm of mice and men exposed to early life stress, in *Transl Psychiatry* (2018); 8(1): 101

<sup>68</sup> COSTA D L, Scarring and mortality selection among civil war pows: A long term mortality, morbidity and socio-economic follow-up, in *Demography* (2012); 49: 1185–1206.

<sup>69</sup> PERSSON P, ROSSIN-SLATER M, Family ruptures, stress, and the mental health of the next generation. *Am Econ Rev* (2018); 108:1214–1252

di ereditarietà si è dimostrata mutevole in risposta alle variazioni ambientali. Infatti, gli effetti materni sono stati dimostrati in molte specie e servono da importante spunto per lo sviluppo della progenie<sup>70</sup>. Il lungo periodo d'interazione pre- e post-natale fra madre e bambino nei mammiferi, fondamentale per la crescita e lo sviluppo, espone però la prole all'influenza materna attraverso diversi meccanismi a lungo termine per la salute fisiologica e psicologica.

Uno studio sullo stress prenatale e sulla malnutrizione materna<sup>71</sup> ha dimostrato come questi effetti avvengano attraverso mutamenti nel sistema neuroendocrino e nella fisiologia materna appunto, producendo di conseguenza un cambiamento nello sviluppo neurologico del feto.

Allo stesso modo, i figli che vengono allattati dalle madri risultano essere caratterizzati da fenotipi con maggiori livelli di serotonina e più rilassati; i bambini invece più stressati o che hanno subito meno attenzione e cura da parte delle loro madri, hanno livelli serotoninici più bassi<sup>72</sup>.

Tutto ciò dimostra perciò che le attenzioni ricevute da un bambino nella prima infanzia possono produrre trasformazioni nello sviluppo dei sistemi neurali che regolano la risposta alla novità e al comportamento sociale<sup>73</sup>.

Si parla a tal proposito di responsabilità epigenetica dei genitori<sup>74</sup> sulla salute dei propri figli, in questo caso con i loro comportamenti e di predisposizione a fornire il contesto più sano ed idoneo alla crescita. In particolare, l'ambiente e i comportamenti materni per un soggetto in via di sviluppo possono determinare un ruolo critico nell'adattare i modelli di comportamento degli adulti. Inoltre, ci può essere trasmissione di questi effetti alle generazioni successive attraverso alterazioni nel comportamento riproduttivo della prole. Pertanto, il trauma materno può essere trasmesso dalle madri alle figlie, e anche alle nipoti<sup>75</sup>.

## 2.4 PLASTICITA' NEURONALE

Gli studi sulle neuroscienze e sulla plasticità neuronale cominciano ad affermarsi dagli anni 80 in poi, quando si asserisce che il cervello risponde a fattori legati all'esperienza, compresi appunto i traumi<sup>76</sup>.

<sup>70</sup> WEINSTOCK M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun.* (2005); 19:296–308.

<sup>71</sup> MARTIN-GRONERT M S, OZANNE SE. Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring. *Biochem Soc Trans.* (2006); 34: 779–82.

<sup>72</sup> YOUNGSON N A, WHITELAW E, Transgenerational epigenetic effects. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2008); 9: 236-238

<sup>73</sup> MEANEY M J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci.* (2001); 24: 1161–92

<sup>74</sup> YOUNGSON N A, WHITELAW E, Transgenerational epigenetic effects. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2008); 9: 236-238

<sup>75</sup> YEHUDA R, LEHRNER A, Intergenerational transmission of trauma effects: putative role of epigenetic mechanisms, in *World Psychiatry* (2018); 17(3): 243–257

<sup>76</sup> MATEOS-APARICIO P, RODRIGUEZ-MORENO A, The Impact of Studying Brain Plasticity, in *Front Cell Neurosci.* (2019); 13: 66.

La plasticità neuronale, definita come malleabilità del cervello in risposta a stimoli endogeni ed esogeni<sup>77</sup> è data da stimoli endogeni essenziali per il normale sviluppo dell'individuo, il funzionamento del sistema nervoso e l'acquisizione di nuovi comportamenti motori.

E' stato dimostrato che la neurogenesi continua anche in età post adolescenziale, e, tra queste aree, è stato descritto il giro dentato dell'ippocampo, ossia la regione cerebrale coinvolta nell'immagazzinamento di tutte le informazioni ed esperienze della nostra vita<sup>78</sup>.

Il rimodellamento tissutale, infatti, può avvenire anche senza modifica della conta totale cellulare, o del luogo, o della distribuzione, né della densità o l'area totale delle sinapsi.

Alcuni studi hanno affermato che il fenomeno della neurogenesi nell'ippocampo è innescata dal dolore: è quindi l'esperienza dolorosa ad assumere un ruolo primario, in quanto evento sensoriale in grado di stimolare la neurogenesi nell'ippocampo<sup>79</sup>.

Quando si verifica un evento a cui segue una forte sensazione di dolore cronico (indipendentemente che sia fisico o psichico), quell'evento necessita di una nuova struttura neurale, che porta ad una memoria biologica dell'evento<sup>80</sup>.

Tutte quelle esperienze che ricadono nella categoria degli eventi stimolati da forti componenti nocicettive richiedono una nuova famiglia di neuroni. Inoltre, se si arriva ad una vera e propria condizione di trauma psichico, magari perpetrato nel tempo, il ricordo dolorifico viene immediatamente impresso e trasmesso epigeneticamente alla prole (microRNA)<sup>81</sup>.

Sono sette le attività che si verificano nel nostro cervello in risposta ad un evento traumatico di tipo psichico:

1. la neurogenesi;
2. la migrazione cellulare;
3. cambiamenti nell'eccitabilità neuronale;
4. cambiamenti nella neurotrasmissione;
5. generazione di nuove connessioni;
6. modificazione delle connessioni esistenti;
7. neoangiogenesi.

<sup>77</sup> MATEOS-APARICIO P, RODRIGUEZ-MORENO A, The Impact of Studying Brain Plasticity, in *Front Cell Neurosci.* (2019); 13: 66.

<sup>78</sup> BARLOW C, TARGUM PhD ShD, Hippocampal Neurogenesis, in *Psychiatry (Edgmont)* (2007); 4(5): 18–20.

<sup>79</sup> SENKOWSKI D, HOFLE M, ENGEL A K, Crossmodal shaping of pain: a multisensory approach to nociception, in *Trends Cogn Sci.* (2014); 18(6): 319-27.

<sup>80</sup> RODGERS A B, MORGAN C P, Leu N A, Bale T L, Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress, in *Proc Natl Acad Sci USA* (2015) 3;112(44):13699-704

<sup>81</sup> RODGERS A B, MORGAN C P, Leu N A, Bale T L, Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress, in *Proc Natl Acad Sci USA* (2015) 3;112(44):13699-704.

La plasticità neuronale del tessuto nervoso consiste nell'efficienza della trasmissione tra i neuroni e può dipendere dai cambiamenti adattativi nelle molecole presinaptiche, extracellulari o postsinaptiche.

La plasticità sinaptica, invece, dipende dalle modifiche che le sinapsi – in base all'attività neuronale – attivano e contribuisce così all'omeostasi funzionale del cervello: la connettività fra le cellule si riduce in risposta ad un'elevata attività neuronale ed aumenta quando invece l'attività si riduce<sup>82</sup>.

L'iper-regolazione cellulo-sinaptica serve per dare nuova forma ai neuroni modulandoli in due direzioni: senso adattativo o in senso mal-adattativo. Nel primo caso, i nostri comportamenti risultano seguenti ad un processo di adattamento. Nel secondo caso, invece, gli atteggiamenti o risposte saranno poco compatibili con l'ambiente esterno e, quindi, produrranno effetti indesiderati come espressione di una tossicità della psiche, e quindi a nocimento della salute dell'individuo. Questo processo neurobiologico mal-adattivo può iniziare già durante la vita intrauterina, oppure può anche essere trasmesso dagli spermatozoi, portando il bambino a sviluppare possibili sintomi come l'epilessia.

## 2.5 DISTURBI SOCIO-RELAZIONALI: AGGRESSIVA' E CRIMINI VIOLENTI

I primi studi fra la correlazione che corre tra genetica e i comportamenti violenti furono svolti dal medico antropologo Lombroso già nel 1876, quando evidenziò una fossetta occipitale mediana alla base del cranio, tipica degli stadi embrionali, durante l'autopsia di un bandito. Lombroso proseguì poi formulando una propria teoria sul crimine, secondo cui i delinquenti sarebbero stati caratterizzati da particolari singolarità somatiche o costituzionali.

Più di recente, gli studi sono stati indirizzati verso le basi biologiche di tali condotte, tralasciando se contro legge o meno; si sta facendo perciò sempre più strada un approccio interdisciplinare allo studio del crimine in cui l'interazione tra biologia ed ambiente rappresenta la chiave di volta<sup>83</sup>.

E' stato riscontrato che i soggetti biologicamente più sensibili o appartenenti a fasce sociali disagiate - o soggetti che vivono in ambienti criminogenici<sup>84</sup> - risultano più predisposti al comportamento antisociale e che le cause sociali del crimine colpiscono in modo più significativo tali individui, configurando un ruolo di "genetica sociale" o comportamentale.

Alcuni studi su famiglie che hanno presentato episodi di aggressività hanno confermato la possibile influenza dei fattori ereditari sul comportamento antisociale, tanto da parlare di una forte influenza della genetica ereditata<sup>85</sup>.

<sup>82</sup> KANDEL, SCHWARTZ, JESSELL, SIEGELBAUM, HUDSPETH, *Principi di neuroscienze* (2014).

<sup>83</sup> RAFLER N H, *The criminal brain: Understanding biological theories of crime*. New York University Press (2008).

<sup>84</sup> WALSH A, BEAVER K M, *Biosocial criminology: New directions in theory and research*: Routledge (2009).

<sup>85</sup> VIDING E, LARSSON H, JONES A P, *Quantitative genetic studies of antisocial behaviour in Philosophical Transactions of the Royal Society of London* (2008); 363: 2519-2527.



I bambini, dunque, apprenderebbero il comportamento aggressivo dall'ambiente e dai modelli circostanti (influenza del fenotipo) e lo sviluppo del comportamento antisociale sarebbe innescato dall'eccessiva esposizione a tali modelli negativi<sup>86</sup>.

Il massimo del comportamento aggressivo si esprime molto presto (a circa 2-3 anni) e, durante la fase di crescita, i bambini viene insegnato a controllarla tramite continue interazioni con l'ambiente circostante; coloro i quali non gestiscono e non imparano come adeguare tali comportamenti, diverranno molto più facilmente dei soggetti violenti<sup>87</sup>.

Molti sono i fattori implicati nell'apprendimento dell'autocontrollo, soprattutto a partire dalla prima infanzia tra cui, uso e abuso di sostanze, problemi di adattamento, condizioni socio-economiche<sup>88</sup>.

In letteratura è stato dimostrato che i meccanismi coinvolti cambiano da generazione in generazione e che l'apprendimento non dipende solo dai fattori ambientali, ma da interazioni tra l'ambiente e la singola propensione genetica.

Negli anni successivi, è stato possibile individuare e confermare con specifiche analisi di laboratorio anomalie cromosomiche eventualmente presenti e riscontrabili nel materiale genetico di soggetti che perpetravano condotte antisociali.

Tali analisi riportano che nei soggetti con comportamenti antisociali sarebbero state evidenziate alterazioni strutturali e/o funzionali nelle regioni specificamente coinvolte nella regolamentazione delle emozioni e nel controllo del comportamento, come ippocampo e amigdala<sup>89</sup>.

Sempre più geni risultano modulare i comportamenti aggressivi; i meccanismi epigenetici possono perciò agire in senso disfunzionale andando a reprimere, o talvolta attivare, la loro trascrizione.

I percorsi biochimici identificati più di recente e correlati a comportamenti violenti sono rappresentati dagli ormoni sessuali, dallo stress e dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, dagli squilibri metabolici e, soprattutto, dai neurotrasmettitori (serotonina e dopamina)<sup>90</sup>.

Il ruolo dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene viene monitorato attraverso i livelli ormonali di cortisolo: l'interazione tra i diversi ormoni corticosteroidi (testosterone e cortisolo) è correlata con la propensione ai comportamenti antisociali<sup>91</sup>.

E' bene comunque sottolineare che pochi loci hanno un effetto diretto, veloce e netto sull'aggressività del singolo ed è perciò necessario valutare l'impatto dei geni non in mero modo isolato e deterministico,

<sup>86</sup> TREMBLAY R E, SZYF M, Developmental origins of chronic physical aggression and epigenetics, in *Epigenomics* (2010); 2(4): 495- 499.

<sup>87</sup> TREMBLAY R E, Developmental origins of disruptive behaviour problems: the 'original sin' hypothesis, epigenetics and their consequences for prevention. *Journal of Child Psychology & Psychiatry* (2010); 51(4): 341-367

<sup>88</sup> TREMBLAY R E, Developmental origins of disruptive behaviour problems: the 'original sin' hypothesis, epigenetics and their consequences for prevention. *Journal of Child Psychology & Psychiatry* (2010); 51(4): 341-367.

<sup>89</sup> SIEVER L J, Neurobiology of aggression and violence, in *American Journal of Psychiatry* (2008); 165: 429-442

<sup>90</sup> CRAIG I W, HALTON K E, Genetics of human aggressive behaviour, in *Human Genetics* (2009); 126: 101-113

<sup>91</sup> TERBURG D, MORGAN B, VAN HONK J. The testosterone cortisol ratio: A hormonal marker for proneness to social aggression, in *International Journal of Law and Psychiatry* (2009); 32: 216-223



ma all'interno di percorsi biochimici nei quali genetica ed epigenetica si intrecciano ed influenzano l'una con l'altra.

Uno degli studi più importanti<sup>92</sup> tra le varianti funzionali della MAO-A e l'esposizione a fattori ambientali stressanti ha analizzato la relazione tra polimorfismi funzionali del gene per la MAO-A in circa 450 giovani maschi maltrattati in età infantile e con successivo sviluppo di comportamento aggressivo: i portatori degli alleli a bassa funzionalità della MAO-A avevano maggiori probabilità di sviluppare comportamenti antisociali, rispetto a coloro che erano state vittime di maltrattamenti, ma che presentavano un genotipo codificante per un alto livello di funzionamento della MAO-A.

In questi casi, il contesto sociale rappresentava solo uno dei fattori innescanti l'espressione dell'informazione già scritta sul DNA.

La spiegazione biochimica ai comportamenti violenti di questi soggetti risiederebbe nella metilazione/demetilazione del gene che codifica per i recettori dei glucocorticoidi (coinvolti nella risposta allo stress).

Un'ulteriore ipotesi è che vi siano anche differenze di genere: negli uomini, il testosterone avrebbe un effetto marcato nel gestire l'aggressività rispetto alle donne, con un rischio di sviluppare atteggiamenti violenti nella popolazione generale addirittura di dieci volte maggiore<sup>93,94</sup> al netto di fluttuazioni dei livelli ormonali legati all'età, alle condizioni patologiche o ambientali ed ai ritmi circadiani.

---

<sup>92</sup> FERGUSSON D M, BODEN J M, HORWOOD L J, MILLER A L, KENNEDY M A, MAOA, abuse exposure and antisocial behaviour: 30-year longitudinal study, in *Br J Psychiatry*, (2011);198(6): 457-63

<sup>93</sup> TARDIFF K, SWEILLAM A, Assault, suicide, and mental illness, in *Archives of General Psychiatry* (1980); 37(2): 164-169.

<sup>94</sup> MONAGHAN E, GLICKMAN S, Hormones and aggressive behaviour, in Becker J, Breedlove S, Crews D, (Eds.), *Behavioral endocrinology* (1992).

## CAPITOLO III – L'EPIGENETICA & LE SOSTANZE D'ABUSO

### 3.1 SOSTANZE D'ABUSO

È noto che i farmaci, o gli xenobiotici in generale, inducano cambiamenti epigenetici nelle più disparate regioni del cervello: sono diversi i geni ad essere coinvolti, tanto che le modifiche possono perdurare ed essere poi trascritte nel codice epigenetico anche dopo l'eliminazione della sostanza in questione dal sistema. Wong<sup>95</sup> ha riferito che il consumo a breve termine di sostanze d'abuso e la loro overdose sono responsabili di numerose variazioni epigenetiche di lunga durata nel cervello dei roditori. Cannabinoidi, oppiacei e cocaina sono noti per produrre numerosi effetti prettamente fisici, tra cui la dipendenza. Anche se possono causare sintomi apparentemente benigni e più noti come l'euforia e le sensazioni intensificate, possono anche portare a dannosi effetti a lungo termine, soprattutto in ambito cognitivo tra cui si annoverano astinenza, cambiamenti neurologici, danni agli organi e persino cambiamenti epigenetici<sup>96,97</sup>. È stato, infatti, dimostrato che l'abuso di droghe causa cambiamenti epigenetici nel tessuto cerebrale con ruoli importanti nel fenomeno della dipendenza<sup>98</sup> negli umani. Gli eventi, specialmente quelli ad alto livello di gratificazione, si imprimono nella mente e nei ricordi e guidano i soggetti umani nelle esperienze; ogni esperienza è, dunque, legata alla ricerca di quella prima sensazione di benessere: è così che il fenomeno della tossicodipendenza si instaura alla ricerca di quella gratificante sensazione primaria di benessere.

Il frequente consumo di tali sostanze diventa poi velocemente abuso, che provoca effetti tossici anche sulla psiche – e di conseguenza sul comportamento – di chi ne fa uso.

La dipendenza da qualsiasi tipo di droga è riconosciuta come malattia ed è un percorso distruttivo e complicato, che integra la genetica ai fattori ambientali, per sopraffare la capacità dei percorsi neurali di elaborare il normale processo di *reward*<sup>99,100,101</sup>. La dopamina è il principale neurotrasmettitore alla base di tutti i circuiti cerebrali innescati dalle dipendenze: gli stress acuti stimolano l'attivazione del sistema dopaminergico, alterando la responsività dell'individuo a futuri stimoli (alimentando il sistema del *reward*).

<sup>95</sup> C.C.Y. Wong, J. Mill, C. Fernandes, Drugs and addiction: an introduction to epigenetics, *Addiction* 106 (2011) 480–489, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1360-0443.2010.03321.x>.

<sup>96</sup> TSANKOVA N M, BERTON O, RENTHAL W, KUMAR A, NEVE R L, NESTLER E J, Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action, in *Nat Neurosci* (2006); 9: 519-25.

<sup>97</sup> *J Neuroimmune Pharmacol* (2013) 8:1181–1196 DOI 10.1007/s11481-013-9508-y

<sup>98</sup> D. Sulzer, How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission, *Neuron* 69 (2011) 628–649, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.010>

<sup>99</sup> D. Sulzer, How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission, *Neuron* 69 (2011) 628–649, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.010>

<sup>100</sup> J.J. Day, D. Childs, M.C. Guzman-Karlsson, M. Kibe, J. Moulden, E. Song, A. Tahir, J.D. Sweatt, DNA methylation regulates associative reward learning, *Nat. Neurosci.* 16 (2013) 1445–1452, <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3504>

<sup>101</sup> S.J. Russo, E.J. Nestler, The brain reward circuitry in mood disorders, *Nat. Rev. Neurosci.* 14 (2013) 609–625, <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3381>

La dipendenza aumenta anche la suscettibilità di una persona a quella determinata sostanza e in modo particolare ostacola la sua capacità di ridurre il consumo<sup>102</sup>.

La metilazione del DNA è stata collegata a vari casi di tossicodipendenza e disturbi psichiatrici: uno studio<sup>103</sup> ha dimostrato che alcuni adolescenti protagonisti di eventi traumatici nella prima infanzia sviluppano un'incrementata tendenza all'uso ed abuso di droghe, rispetto al campione di controllo. In base a queste evidenze, gli studi si concentrano sui meccanismi alla base dei quali i traumi interferiscono sul profilo genetico, rendendo un soggetto più predisposto rispetto ad un altro, oltre a sviluppare trattamenti farmacologici *ad hoc* per la prevenzione.

Dal punto di vista molecolare, gli studi si sono indirizzati sui polimorfismi a singolo nucleotide ritrovati nel gene per il recettore della dopamina DRD2 e nel gene *ANKK1* che regola DRD2<sup>104,105</sup>. I cambiamenti epigenetici sono dunque implicati a vario titolo sia nella tossicodipendenza che nell'instaurarsi del fenomeno di tolleranza<sup>106,107</sup>.

Nel presente lavoro di tesi gli aspetti innovativi della ricerca, in tal senso, sono molteplici: in letteratura non sono noti i valori dei biomarker di danno ossidativo o di metilazione al DNA (ricercati in matrice urinaria) in soggetti deceduti con storia pregressa di abuso da sostanze stupefacenti, né tantomeno se sia possibile ottenere una correlazione tra il consumo di sostanze d'abuso e i valori dei suddetti biomarkers. Inoltre, in letteratura poco ancora è stato pubblicato sulla ricerca dei biomarkers ossidativi in matrice salivare e la stessa letteratura è scarsa dal punto di vista della correlazione con droghe.

Uno studio retrospettivo ha evidenziato che l'atto in sé di abusare di sostanze stupefacenti, indipendentemente dalla sostanza assunta, costituirebbe un comportamento di tipo delinquenziale, piuttosto che essere una causa conseguente a comportamenti antisociali<sup>108</sup>. A supporto della teoria che la droga porti a comportamenti antisociali e sia responsabile di alterazioni epigenetiche, vi sono studi<sup>109</sup> su

<sup>102</sup> M.M. Torregrossa, P.R. Corlett, J.R. Taylor, Aberrant learning and memory in addiction, *Neurobiol. Learn. Mem.* 96 (2011) 609–623, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2011.02.014>.

<sup>103</sup> KHOURY L, TANG Y L, BRADLEY B, CUBELLS J F, RESSLER K J, Substance use, childhood traumatic experience, and Posttraumatic Stress Disorder in an urban civilian population, in *Depress Anxiety* (2010); 27(12): 1077-1086

<sup>104</sup> MICHPOULOS V, ROTHBAUM A O, Jovanovic T et al., Association of CRP genetic variation and CRP level with elevated PTSD symptoms and physiological responses in a civilian population with high levels of trauma, in *Am. J. Psychiatry* (2015); 172(4): 353-362.

<sup>105</sup> NAGANO-SAITO A, DAGHER A, BOOIJ L et al. Stress-induced dopamine release in human medial prefrontal cortex--18F-fallypride/PET study in healthy volunteers, in *Synapse.* (2013);67(12): 821-830

<sup>106</sup> Renthal W, Nestler EJ. Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med.* 2008 Aug;14(8):341-50. doi: 10.1016/j.molmed.2008.06.004. Epub 2008 Jul 16. PMID: 18635399; PMCID: PMC2753378.

<sup>107</sup> Molecular Pharmacology Fast Forward. Published on February 25, 2014 as DOI: 10.1124/mol.114.091728

<sup>108</sup> CORRADINI B, ALÙ M, SANCHEZ-DIZ P, ESTANY-GESTAL A, LICATA M, VANDELLI D, BEDUSCHI G, CARRACEDO A, FERRI G, Genetica delle dipendenze in Medicina Legale: analisi di mutazioni associate allo sviluppo da dipendenza da nicotina e cannabis, Atti XXIII. Convegno Nazionale di Genetisti Forensi Italiani (Ge.F.I.), in *Genetica Forense e diritto: prospettive scientifiche, tecnologiche e normative* (2010).

<sup>109</sup> EFIMOVA O A, KOLTSOVA A S, KRPIVIN M I, TIKHONOV A V, PENDINA A A, Environmental Epigenetics and Genome Flexibility: Focus on 5-Hydroxymethylcytosine, in *Int JMol Sci.* (2020); 2:21(9).

vari indicatori come la 5-Metilcitosina ed il ciclo di metilazione/demetilazione del DNA che include altri tre derivati ossidati:

1. la 5-idrossimetilcitosina (5OHMeCyt);
2. la 5-formilcitosina (5-fC);
3. la 5-carbossilcitosina (5-caC).

Come già ricordato, la 5OHMeCyt è una forma chimica prevalentemente stabile e funge sia da prodotto intermedio della demetilazione del DNA che da promotore della regolazione epigenetica.

La 5OHMeCyt è, quindi, un ottimo indicatore per le risposte epigenetiche mediate da fattori esterni: le ultime ricerche sopracitate sugli effetti avversi indotti dall'ambiente affermano che l'esposizione a farmaci o sostanze d'abuso, nonché inquinanti ambientali, possono modificare il normale meccanismo di regolazione. L'idrossimetilazione del DNA produce un biomarker sensibile e specifico per molti fattori ambientali dannosi, ognuno dei quali ha come obiettivo specifico la 5OHMeCyt in organi e tessuti.

Di seguito sono riportati in breve gli aspetti principali legati alle modificazioni epigenetiche e non riguardanti le sostanze più comunemente utilizzate, raggruppate per categoria: cannabis, oppioidi, metamfetamine, cocaina e alcol.

### 3.1.1 Cannabis

La cannabis è una delle droghe illecite di cui abusano più frequentemente adolescenti e adulti in tutto il mondo; in varie condizioni patologiche e di esposizione alla cannabis, l'espressione del recettore *CNR1* viene disregolata<sup>110,111</sup>.

Un altro studio sulla cannabis ha evidenziato polimorfismi di singolo nucleotide all'interno dei 2 geni *CNR1* (recettore 1 dei cannabinoidi) e *FAAH* (Fatty acid amide hydrolase): questi codificano per strutture recettoriali ed enzimatiche coinvolte nel meccanismo biologico d'azione e d'interazione alla cannabis<sup>112</sup>.

L'esposizione dei genitori o della madre alla cannabis ha il potenziale di influenzare lo stato di metilazione della prole. Inoltre, alcuni ricercatori danesi hanno identificato una singola variante del gene *CHRNA2* (cholinergic receptor nicotinic  $\alpha 2$  subunit), che influisce sul rischio di diventare dipendenti dalla cannabis in futuro. Il gene è stato identificato confrontando i genomi di oltre 2.000 persone con disturbo rispetto a quasi 50.000 che non soffrono di questa condizione.

Ovviamente, la mera presenza del gene non rende automaticamente un soggetto fumatore dipendente di cannabis, ma può aumentare il rischio di sviluppare dipendenza per quei soggetti vulnerabili che dovessero provarla; nello studio sono anche state adottate misure affinché il legame tra gene e disturbo non fosse inficiato da altri fattori confondenti: né fattori confondenti come il fumo di sigaretta né la schizofrenia erano responsabili della connessione con l'abuso di cannabis<sup>113</sup>.

Dati precedenti, infatti, mostrano che la schizofrenia può aumentare il rischio di uso di cannabis e viceversa, suggerendo che alcuni geni possono avere un ruolo in entrambi i fenomeni<sup>114</sup>.

### 3.1.2 Oppioidi

Gli oppioidi sono generalmente somministrati per via endovenosa come antidolorifici e sono in grado di causare velocemente dipendenza fisica e tolleranza. Nei casi di dipendenza da oppiacei, sostanze come la morfina, la  $\beta$ -endorfina e i farmaci analgesici oppioidi colpiscono principalmente il recettore  $\mu$ -oppioide, codificato dal recettore oppioide  $\mu$ -1 (*OPRM-1*).

<sup>110</sup> Sami, M. B., & Bhattacharyya, S. (2018). Are cannabis-using and non-using patients different groups? Towards understanding the neurobiology of cannabis use in psychotic disorders. *Journal of psychopharmacology* (Oxford, England), 32(8), 825–849. <https://doi.org/10.1177/0269881118760662>

<sup>111</sup> Murphy, T., Matheson, J., Mann, R. E., Brands, B., Wickens, C. M., Tiwari, A. K., Zai, C. C., Kennedy, J., & Le Foll, B. (2021). Influence of Cannabinoid Receptor 1 Genetic Variants on the Subjective Effects of Smoked Cannabis. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7388. <https://doi.org/10.3390/ijms22147388>

<sup>112</sup> AGRAWAL A, WETHERILL L, DICK D M, XUEI X, HINRICHS A, HESSELBROCK V, KRAMER J, NUMBERGER J I Jr, SCHUCKITN M, BIERUT L J, EDENBERG H J, FOROUD T, Evidence for association between polymorphisms in the cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene and cannabis dependence, in *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* (2009); 150 B(5): 736-40.

<sup>113</sup> Genome-wide association study implicates *CHRNA2* in cannabis use disorder | *Nature Neuroscience*

<sup>114</sup> Genome-wide association study implicates *CHRNA2* in cannabis use disorder | *Nature Neuroscience*

Questo studio mostra l'ipermetilazione in un sito CpG nella regione del promotore dello sperma *OPRM-1* e suggerisce che il cambiamento epigenetico, dovuto alla dipendenza da oppiacei, può passare alla prole, oltre che al DNA dei leucociti dei tossicodipendenti da oppiacei (che mostra ipermetilazione nei siti CpG di *OPRM-1*).

È stato studiato l'effetto dell'uso materno di oppiacei sullo stato di metilazione del bambino: uno studio di McLaughlin<sup>115</sup> sui neonati di madri dipendenti da oppioidi in terapia con metadone ha stabilito che l'esposizione agli oppioidi in utero è collegata a livelli di metilazione del DNA alterati nei geni correlati agli oppioidi nei neonati. La percentuale di metilazione di tutti e tre i geni è risultata più alta nei neonati esposti agli oppioidi in utero rispetto ai neonati di controllo.

Quindi, sia l'esposizione parentale che quella intrauterina agli oppioidi influenzano i modelli di metilazione nella prole; ciò può incidere sulla loro sensibilità e comportamento complessivi rispetto alla sostanza e predisporre il soggetto alla dipendenza<sup>116</sup>.

La metilazione si verifica a tassi più elevati negli ex tossicodipendenti di origine ispanica rispetto ai tossicodipendenti di origine afroamericana, indicando variabilità nel grado di metilazione tra popolazioni di diverse etnie<sup>117</sup>.

È noto come gli oppioidi influenzino le cellule legandosi a un recettore oppioide accoppiato a proteine G (*GPCR*), avviando poi cascate di segnalazione intracellulare come la proteinchinasi (*PKA*)<sup>118</sup>, fosfoinositide-3 chinasi (*PI3K*)<sup>119</sup> ed il recettore extracellulare chinasi (*ERK*)<sup>120</sup>. Ciò si traduce in diversi effetti a cascata, inclusa la riduzione dei livelli della forma ridotta di glutazione (*GSH*) ed elevato stress ossidativo<sup>121</sup>, sebbene il meccanismo e le conseguenze di queste azioni non siano ancora ad oggi chiare. Uno studio ha indagato l'influenza acuta e a lungo termine di morfina sullo stato di ossidoriduzione e metilazione (inclusi i livelli di metilazione del DNA) in coltura di specifiche cellule neuronali. Agendo tramite i recettori oppioidi  $\mu$ , la morfina inibisce la captazione della cisteina mediata attraverso molteplici vie di segnalazione, che coinvolgono diverse proteine G e proteinchinasi. La diminuzione

<sup>115</sup> McLaughlin P, Mactier H, Gillis C, Hickish T, Parker A, Liang WJ, Osselton MD. Increased DNA Methylation of ABCB1, CYP2D6, and OPRM1 Genes in Newborn Infants of Methadone-Maintained Opioid-Dependent Mothers. *J Pediatr*. 2017 Nov;190:180-184.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.07.026. Epub 2017 Sep 1. PMID: 28867064.

<sup>116</sup> Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28

<sup>117</sup> Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28

<sup>118</sup> Marissa A Bernstein, Sandra P Welch,  $\mu$ -Opioid receptor down-regulation and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation in a mouse model of chronic morphine tolerance, *Molecular Brain Research*, Volume 55, Issue 2, 1998, Pages 237-242, ISSN 0169-328X, [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00005-9).

<sup>119</sup> Yin et al, 2006. Morphine promotes Jurkat cell apoptosis through pro-apoptotic FADD/P53 and anti-apoptotic PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathways

<sup>120</sup> In Vivo Regulation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase (ERK) and Protein Kinase B (Akt) Phosphorylation by Acute and Chronic Morphine Daniella L. Muller and Ellen M. Unterwald *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* August 1, 2004, 310 (2) 774-782; DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.104.066548>

<sup>121</sup> Goudas, Leonidas C. MD, PhD<sup>\*</sup>; Langlade, Agnes MD, PhD<sup>‡</sup>; Serrie, Alain MD, PhD<sup>‡</sup>; Matson, Wayne<sup>§</sup>; Milbury, Paul<sup>§</sup>; Thurel, Claude MD<sup>‡</sup>; Sandouk, Pierre MD<sup>¶</sup>; Carr, Daniel B. MD, FABPM<sup>\*\*</sup> Acute Decreases in Cerebrospinal Fluid Glutathione Levels after Intracerebroventricular Morphine for Cancer Pain, *Anesthesia & Analgesia*: November 1999 - Volume 89 - Issue 5 - p 1209-1215 doi: 10.1213/0000539-199911000-00023

dell'assorbimento di cisteina è stata associata a diminuzioni sia nello stato di ossidoriduzione che di metilazione delle cellule neuronali, come definito dai rapporti di glutatione ridotto (GSH) a forme ossidate (GSSG) e S-adenosilmetionina (SAM) a S-adenosilomocisteina (SAH). Inoltre, la morfina induce metilazione sul DNA, compresi i siti CpG nei retrotrasposoni, con conseguente aumento di mRNA. Insieme, questi risultati illuminano il meccanismo con cui la morfina, e potenzialmente altri oppioidi, possono influenzare l'ossidoriduzione delle cellule neuronali e lo stato di metilazione incluso metilazione del DNA.

### 3.1.3 Metanfetamine

La metanfetamina (METH) è una sostanza psicostimolante, comunemente usata a scopo voluttuario, che agisce sul sistema nervoso centrale e può portare a dipendenza. Essa influisce sullo stato di metilazione della regione del cervello<sup>122</sup>.

Le esperienze di gratificazione positiva associate alle droghe d'abuso, come le metanfetamine, aumentano la vulnerabilità alle recidive all'uso della sostanza, innescandone il desiderio e aumentando il disturbo.

Il *nucleus accumbens* (NAc) è essenziale per i ricordi associati alla droga, ma i particolari meccanismi sono ancora poco conosciuti. Le modificazioni post-traduzionali della cromatina, come la metilazione dell'istone, modulano la trascrizione genica; nei ratti è stata segnalata una riduzione dei livelli di metilazione delle sequenze promotrici del recettore 1 del glutammato (GluA1) e del recettore 2 del glutammato striatale (GluA2) in risposta a METH. Inoltre, è stato osservato che la METH altera l'espressione di DNMT1 nell'mRNA del cervello di ratto che può essere correlato alla metilazione del DNA<sup>123</sup>.

Ci sono inoltre diversi risultati che mostrano effetti multigenerazionali nella prole di roditori gravidi esposti a METH durante il periodo gestazionale. Un recente studio sulla neurotossicità della METH nei ratti ha coinvolto il trattamento degli animali con alte dosi di *binge* o dosi croniche di METH; dopo il trattamento *binge*, la metilazione di CpG-2 è diminuita significativamente, mentre il trattamento cronico con METH ha provocato l'ipermetilazione dello stesso sito<sup>124</sup>.

È stato determinato anche l'impatto della metilazione dell'istone (*H3K4me2/3*) sulla formazione e l'espressione della memoria associata ad uso di metamfetamine.

I risultati sono stati i seguenti: un'indagine sulle modifiche della cromatina nel NAc di animali che formano una memoria associata a METH ha rivelato l'induzione globale di diverse modifiche associate alla trascrizione attiva. Ciò è correlato con un modello di attivazione genica, come rivelato dall'analisi con microarray, compresa la sovraregolazione del recettore dell'ossitocina (*Oxtr*) e dell'oncogene

<sup>122</sup> Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28

<sup>123</sup> Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28

<sup>124</sup> Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28



dell'osteosarcoma FBJ (*Fos*), i cui promotori avevano anche aumentato *H3K4me3*. *KD* di *MLL1* ha ridotto i livelli di *H3K4me3*, *Fos* e *Oxtr* e ha interrotto la memoria associata a METH. *KD* di *Kdm5c* ha provocato iper-metilazione di *H3K4* e ha impedito l'espressione della memoria associata ad uso di METH. Lo sviluppo e l'espressione della memoria associata a METH sono quindi supportati dalla regolazione dei livelli di *H3K4me2/3* da parte di *MLL1* e *KDM5C*, rispettivamente, nel NAc.

Questi dati indicano che la metilazione permissiva dell'istone rappresenta potenziale bersaglio per il trattamento delle recidive di abuso di sostanze<sup>125</sup>.

### 3.1.4 Cocaina

La cocaina, uno dei più abusati psicostimolanti, blocca i trasportatori delle monoammine della membrana plasmatica a causa dei quali viene inibita la clearance della dopamina nel cervello. È usata principalmente come droga ricreativa e comunemente sniffata o talvolta iniettata.

Diverse regioni del cervello come i neuroni piramidali dell'ippocampo, la corteccia prefrontale (PFC), lo striato e il NAc hanno mostrato modelli di metilazione del DNA alterati in risposta all'assunzione di cocaina.

Quando viene somministrata in modo ripetuto, induce nel soggetto una risposta comportamentale potenziata nota come sensibilizzazione psicomotoria.

Oltre ai cambiamenti comportamentali, i trattamenti acuti e ripetuti con cocaina determinano un aumento della metilazione del DNA del promotore della subunità catalitica della proteina fosfatasi-1 (PP1C) e un legame aggravato di MeCP2 allo stesso promotore. L'esposizione cronica alla cocaina in ratti e topi provoca iper-metilazione nello striato e ipo-metilazione nel PFC.

L'assunzione passiva e involontaria di cocaina tende a indurre lo stesso effetto sul sistema di memoria della ricompensa cerebrale.

È interessante ed importante notare che l'uso cronico di cocaina ha portato anche a patologie trasmesse fra generazioni. È stato scoperto che l'esposizione paterna alla sostanza causa carenze comportamentali e fisiche nella prole, mostrando così la trasmissione delle cellule germinali; l'esposizione materna alla cocaina in gravidanza invece può alterare i modelli di metilazione nei bambini.

Questo è accompagnato da un'espressione attenuata di enzimi come DNMT1 e DNMT3a, mentre l'espressione di DNMT3b rimane invariata. Anche se c'è un'ampia letteratura disponibile sugli effetti psicologici dell'uso di cocaina da parte dei genitori sulla prole, una ricerca approfondita sugli effetti della metilazione ereditaria è essenziale per decifrare l'impatto ereditario dell'abuso di droghe.

L'abuso di cocaina determina modifiche epigenetiche anche su cellule germinali, spiegando, perciò come la tendenza alla tossicodipendenza possa essere trasmessa fra generazioni: sono state osservate specifiche

<sup>125</sup> Memorie associative. BIOL PSYCHIATRY 2014;76:57–65

modifiche post-traduzionali dell'istone e disordini enzimatici (acetil- o deacetil-transferasi). Studi su ratti<sup>126</sup> ai quali è stata somministrata cocaina ogni giorno hanno confermato gli effetti negativi e disregolatori della sostanza sull'RNA messaggero (con diversi livelli di metilazione), su enzimi come DNA metiltransferasi e TET (componenti funzionali per i meccanismi regolatori tra DNA e modificazioni dell'istone, influenzando direttamente sull'espressione genica). La TET è la proteina responsabile della conversione da 5-metilcitosina a 5OHMeCyt (e successivamente in 5-fC e 5-caC).

### 3.1.5 Alcol

Il consumo di alcol fa parte dei nostri usi e costumi ed ha una lunga storia di utilizzo per aumentare il benessere e la socievolezza. Il soggetto che però non riesce a limitare il consumo di alcol può sviluppare dipendenza caratterizzata da assunzione incontrollata e compulsiva, uso continuo nonostante la conoscenza di problemi di salute e sociali legati ad esso<sup>127</sup>.

La dipendenza dall'alcol è, infatti, un disturbo grave noto per minare la salute globale e contribuire notevolmente a una serie di malattie fisiche, morte prematura, disabilità e condizioni psichiatriche<sup>128</sup>.

Sono stati studiati i fattori genetici che giocano un ruolo importante nell'ereditarietà della dipendenza e nelle prime fasi di dipendenza che portano a disturbi psichiatrici. Rispetto al controllo, vari geni, promotori e siti CpG di alcolisti mostrano livelli di metilazione alterati. Gli effetti dell'alcol sulla metilazione del DNA sono diversi, tra cui l'iper-metilazione in alcuni promotori genici e la tendenza opposta in altri.

Sia il consumo a lungo termine che quello acuto di alcol portano allo sviluppo di cambiamenti epigenetici<sup>129,130</sup>. Questa affermazione è supportata da uno studio che mostra che la metilazione globale del DNA nei leucociti ha una correlazione positiva con l'uso di alcol e nicotina<sup>125</sup>.

In uno studio sulla metilazione del DNA dell'intero genoma nel cervello post mortem di un soggetto alcolizzato, è stato chiaramente dimostrato che i livelli di trascrizione DNMT1 sono ridotti insieme all'ipo-metilazione del DNA del retrotrasposone a ripetizione terminale nella regione della corteccia cerebrale rispetto ai campioni di controllo.

Ci sono alcuni studi che mostrano chiaramente che l'esposizione prenatale all'alcol porta ad alterazioni del contenuto di metilazione nei modelli animali<sup>131</sup>.

<sup>126</sup> VAHER K, ANIER K, JURGENSON M, HARRO J, KALDA A, Cocaine-induced changes in behaviour and DNA methylation in rats are influenced by inter-individual differences in spontaneous exploratory activity, in *J Psychopharmacol* (2020).

<sup>127</sup> G.F. Koob, Alcoholism: allostasis and beyond, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 27 (2003) 232–243, <http://dx.doi.org/10.1097/01.ALC.0000057122.36127.C2>

<sup>128</sup> V. Nieratschker, A. Batra, A.J. Fallgatter, Genetics and epigenetics of alcohol dependence, *J. Mol. Psychiatry* 1 (2013) 11, <http://dx.doi.org/10.1186/2049-9256-1-11>.

<sup>129</sup> S.D. Shukla, J. Velazquez, S.W. French, S.C. Lu, M.K. Ticku, S. Zakhari, Emerging role of epigenetics in the actions of alcohol, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32 (2008) 1525–1534, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00729.x>.

<sup>130</sup> Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28

<sup>131</sup> Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28

## CAPITOLO IV - Parte strumentale

## 4.1 STRUMENTAZIONE PER L'ANALISI DELLE MODIFICAZIONI EPIGENETICHE NELLE MATRICI BIOLOGICHE

La determinazione dei prodotti di ossidazione e metilazione degli acidi nucleici in passato è stata realizzata tramite vari metodi in spettrometria di massa, sia in fase liquida (HPLC-MS/MS) che gassosa (GC/MS<sup>n</sup>), ma anche con tecniche immunometriche meno specifiche e selettive come ELISA.

La spettrometria di massa è diventata la tecnica analitica di riferimento per la determinazione di composti organici e dei loro metaboliti in campioni a base acquosa e per rilevare i prodotti extracellulari derivanti dall'ossidazione nei campioni di urina, evitando l'invasività delle altre procedure di campionamento biologico ed il rischio di artefatti di ossidazione durante la conservazione del campione o l'estrazione del DNA<sup>132,133</sup>.

### 4.1.1 Cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC)

Il termine cromatografia comprende una serie di tecniche che rendono possibile la separazione di miscele di composti chimici sfruttando differenze nelle loro proprietà fisiche o chimiche. Tali differenze regolano la velocità di migrazione dei componenti delle miscele, che sono sospinti sotto l'influenza di un fluido in movimento attraverso un "letto" di fase stazionaria. La fase stazionaria può essere un solido finemente suddiviso o un liquido che lo ricopre; la forma del "letto" può essere uno strato sottile o un impaccamento. La fase mobile, in HPLC, è un liquido. Tra i componenti del campione e la fase stazionaria si producono interazioni che riconoscono alcuni meccanismi fondamentali a seconda che siano sfruttate differenze a livello di coefficienti di ripartizione (cromatografia liquido-liquido), effetti di adsorbimento su superfici (cromatografia solido-liquido), dissociazione di elettroliti deboli o forti (cromatografia di scambio ionico), dimensione e forma molecolare (cromatografia di esclusione sterica). Alla cromatografia in fase liquida sono in realtà riconducibili tutti quei metodi che, basandosi su un principio fondamentale fisico uguale, possono essere descritti esaurientemente con una sola teoria. Si allude alla cromatografia su carta, su strato sottile, di scambio ionico, ad alta capacità (*high pressure* o *high performance liquid chromatography* o HPLC) dove con tale dizione si intende indicare un insieme di qualità del sistema strumentale e cioè alta efficienza separativa, alta velocità di separazione, alta sensibilità e alta pressione. La sigla HPLC, nella accezione universalmente accettata, descrive la tecnica che separa miscele su colonne riempite con piccole particelle (tipicamente con diametro di 10 µm o inferiori) mediante

<sup>132</sup> Protano, C., Andreoli, R., Mutti, A., Petti, S., & Vitali, M. (2014). Biomarkers of oxidative stress to nucleic acids: Background levels and effects of body mass index and life-style factors in an urban paediatric population. *Science of the Total Environment*, 500–501, 44–51. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.095

<sup>133</sup> Manini, P., De Palma, G., Andreoli, R., Goldoni, M., & Mutti, A. (2004). Determination of urinary styrene metabolites in the general Italian population by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 77(6), 433–436. doi.org/10.1007/s00420-004-0526-1

eluizione con un liquido sotto pressione. L'impiego privilegiato di questa tecnica è dovuto a precise caratteristiche degli analiti quali: elevato peso molecolare, bassa volatilità, instabilità termica, presenza di gruppi funzionali ionizzabili e polari. La HPLC è, inoltre, molto flessibile, può consentire difficili separazioni altrimenti non realizzabili e il suo ruolo preminente nel settore dell'analisi chimico-tossicologica è da individuare nella identificazione e determinazione quantitativa di specifiche sostanze o gruppi di sostanze con l'ausilio di un rivelatore a valle.

L'attrezzatura di base per HPLC comprende un serbatoio per l'eluente (fase mobile), una pompa per pressioni elevate, preceduta da un dispositivo di gradiente, un campionatore, una colonna in acciaio (le più comuni sono lunghe da 3 a 20 cm e hanno diametro interno di pochi micron), un rivelatore e un registratore. La visualizzazione dei composti separati in HPLC avviene attraverso rivelatori la cui scelta deve essere fondata sulle proprietà degli analiti e sulle concentrazioni attese. Il rivelatore più promettente e versatile è lo spettrometro di massa, soprattutto in seguito all'avvento delle colonne microimpaccate che, avendo parzialmente rimosso l'ostacolo costituito dalla necessità di allontanare l'eccesso di solvente prima di introdurre i composti eluiti nella camera di ionizzazione, consentono un accoppiamento diretto tra cromatografo e spettrometro. Il parametro di ritenzione meglio utilizzabile per identificare un composto in un dato sistema HPLC in condizioni costanti è il fattore di capacità  $K$ , che corrisponde al rapporto della quantità di soluto nella fase stazionaria e della quantità di soluto nella fase mobile ad ogni punto in equilibrio della colonna. Il fattore  $K$ , anche chiamato  $K'$  o rapporto di capacità della colonna, è definito dall'equazione seguente:

$$K = \frac{V_a - V_0}{V_0}$$

dove il valore  $V_a$  è il valore di eluizione dell'analita  $A$  e  $V_0$  quello di un composto non ritenuto, cioè in pratica il volume interstiziale della colonna. Esso è preferibile al tempo o al volume di ritenzione in quanto indipendente dal flusso, lunghezza e diametro della colonna. A velocità di flusso costante, essendo intercambiabili i volumi di eluizione e i tempi di ritenzione, il fattore  $K$  può essere espresso così:

$$K = \frac{t_A - t_0}{t_0}$$

Anche nel caso di utilizzo di tempi di ritenzione relativi ad uno standard interno è opportuno usarne i valori corretti attraverso la formula:

$$K = \frac{t_A - t_0}{t_B - t_0}$$

### Trattamento del campione e scelta del sistema HPLC

In linea generale il tipo di trattamento al quale il campione biologico deve essere sottoposto prima dell'analisi HPLC dipende dal tipo di matrice, dalla concentrazione dell'analita attesa e dal metodo di rivelazione prescelto (se più o meno sensibile e suscettibile alle interferenze endogene). Per i livelli relativamente elevati (dall'ordine di 1 µg/mL o superiori) può essere sufficiente un semplice trattamento dell'urina con solvente organico (ad es: doppio volume di metanolo o acetonitrile) e successiva centrifugazione onde allontanare le proteine, che andrebbero a contaminare irreversibilmente la colonna, e i sali disciolti, che potrebbero precipitare in colonna. Negli screening tossicologici o nelle analisi mirate a composti in concentrazioni relativamente basse, laddove le interferenze da parte di composti endogeni si fanno acute, sono invece richiesti procedimenti estrattivi con solventi, con possibilità di ottimizzare il recupero degli analiti mediante aggiustamento del pH e della forza ionica della fase acquosa o attraverso l'impiego di agenti atti a formare coppie ioniche. L'estratto organico è poi di norma opportunamente concentrato o addirittura evaporato ed il residuo ripreso in solvente idoneo prima dell'iniezione. In alternativa, l'estrazione può essere realizzata facendo passare il campione su colonne corte riempite di adsorbente solido (ad es. resina XAD, silice, silice legata con C<sub>18</sub>) da cui gli interferenti endogeni sono allontanati con opportuno solvente, prima di rimuovere i composti di interesse con un solvente di più elevata forza eluente. Anche in questo caso la selettività dell'estrazione è controllabile ottimizzando pH e forza ionica del campione e selezionando i solventi di lavaggio.

#### 4.1.2 HPLC-MS/MS

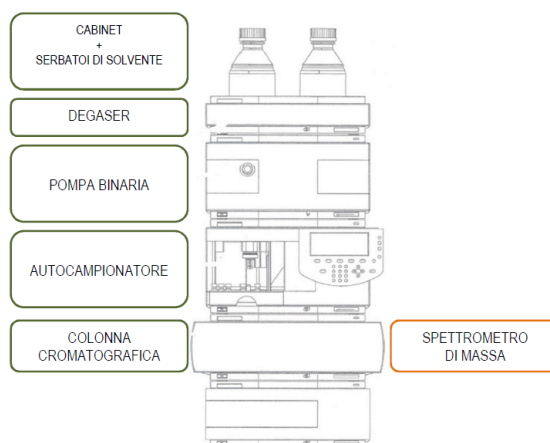
Gli strumenti HPLC Agilent Serie 1100, utilizzato in questo lavoro limitatamente alle analisi in urina, e quello UPLC Waters Acquity I-Mass - utilizzato nelle analisi in matrice salivare - sono composti da più unità separate elencate di seguito (fig. 4). I 5 moduli principali dai quali il sistema è costituito sono rispettivamente<sup>134</sup>:

- Cabinet, per i serbatoi di solvente ed i relativi solventi (Fase A: acquosa; Fase B: organica) che costituiscono il sistema binario della fase mobile;
- Degasser, sistema impiegato per la rimozione di eventuali bolle d'aria;
- Pompa binaria, che può operare fino ad alte pressioni ed è indispensabile per far migrare gli analiti lungo la colonna;
- Autocampionatore per l'introduzione automatizzata del campione;

<sup>134</sup> Vianello (2008) Sviluppo di una metodologia analitica per la determinazione degli amminoacidi contenuti nei leganti a base proteica utilizzati nella pittura a tempera, mediante HPLC-MS/MS. Venezia.

- Colonna cromatografica, alloggiata orizzontalmente su due piastre in un alloggiamento termostato.

Il flusso di eluente in uscita dalla colonna è trasportato attraverso un tubo in peek (polietere etere chetone) all'ingresso del rivelatore a spettrometria di massa. La parte di rivelazione dello strumento utilizzato in questo studio è costituita da spettrometro di massa AB Sciex ed analizzatore a triplo quadrupolo. Il principale vantaggio nell'utilizzo di questo detector, rispetto ad altri sistemi di rivelazione (spettrometro UV, fluorimetro, etc.), risiede nella sensibilità e nella specificità della risposta poiché ogni analita è riconosciuto in base al rapporto massa/carica ( $m/z$ ) degli ioni che ha generato (Mass Range: 50-1000  $m/z$ ). Nel caso di composti non completamente risolti per via cromatografica, lo spettrometro di massa porta comunque all'identificazione e alla quantificazione degli analiti, purché non isobarici (ioni con lo stesso rapporto  $m/z$  ma diversa composizione atomica).



**Fig.4:** rappresentazione dello strumento HPLC

### 4.1.3 Spettrometria di massa

Uno spettrometro di massa è un sistema di rivelazione che si può schematicamente suddividere in quattro parti:

- a) un sistema per l'introduzione del campione nello strumento;
- b) una sorgente di ioni per la ionizzazione del campione;
- c) un analizzatore di massa per la separazione degli ioni secondo il rapporto massa/carica ( $m/z$ );
- d) un sistema di rivelazione delle particelle precedentemente separate.

Le prime tre parti devono essere collegate ad un sistema ad alto vuoto; la quarta parte è invece collegata ad un calcolatore per l'elaborazione dei dati. È possibile quindi definire la spettrometria di massa come una tecnica capace di produrre ioni da composti neutri e di studiare le vie di decomposizioni degli ioni

primari e/o gli ioni frammento. A differenza della maggior parte degli altri metodi fisici di analisi, la spettrometria di massa non si basa su una definita proprietà della molecola ma sulla chimica degli ioni. In analogia alle reazioni chimiche è così caratterizzata da un insieme di fattori, quali la temperatura, la pressione, i tempi, le concentrazioni degli ioni. Inoltre, poiché misura rapporti massa/carica, la spettrometria di massa non fornisce informazioni dirette sulla struttura ionica. Nel campo analitico il miglior uso della spettrometria di massa si raggiunge quando lo strumento è accoppiato ad apparecchiature complementari (cromatografo liquido, come sopra) o ad altri spettrometri di massa e a calcolatori dotati di ampie memorie e di appositi programmi. Tali sistemi risultano infatti idonei al riconoscimento inequivoco e a determinazioni quantitative accurate di analiti presenti in un vasto intervallo di concentrazioni (da parti per milione -ppm a parti per trilione -ppt), anche in matrici complesse e/o disponibili in piccoli quantitativi. Sotto questo profilo la spettrometria di massa è attualmente da ritenere la tecnica più efficace per l'identificazione di farmaci, metaboliti e tossici esogeni in genere in campioni biologici.



## CAPITOLO V - Parte Sperimentale

## 5.1 Parte Sperimentale

Lo sviluppo della parte sperimentale ha previsto la raccolta di campioni biologici\* da due popolazioni diverse:

1) per quanto attiene alla matrice urinaria, le analisi sono state svolte su 39 campioni di soggetti deceduti in età adulta (età minima 21 – età massima 70 anni), di entrambi i sessi per i quali non sono state segnalate particolari malattie. Tali campioni biologici provengono da cadaveri giunti all'Istituto di Medicina Legale per autopsie giudiziarie per i quali è stata ottenuta l'autorizzazione all'analisi di sostanze stupefacenti e per motivi di ricerca, in maniera del tutto anonima. Le analisi sono state svolte mediante utilizzo di cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa con il metodo sviluppato e validato nel laboratorio di Tossicologia Industriale dell'Università di Parma<sup>135</sup>.

2) la seconda popolazione oggetto di studio, da cui sono stati raccolti campioni di fluido del cavo orale, consiste di 66 campioni da soggetti (età minima 18 – età massima 63 anni) in cura presso il SerDP di Parma e di cui sono state raccolte dettagliate informazioni socio-anamnestiche riguardo abitudini e stili di vita, dopo opportuno consenso informato e intervista anamnestica - con conseguente donazione volontaria del campione - per l'analisi strumentale presso l'azienda privata IRBM Spa di Roma.

Abbiamo già citato i prodotti derivanti dall'ossidazione delle basi puriniche e pirimidiniche, come la base modificata della guanina ossia l'8-idrossiguanina (8-OH-Gua) e il suo nucleoside ossidato 8-idrossi-2'deossiguanosina (8-OH-dGua)<sup>136</sup>. La peculiarità dell' 8-OH-dGua è quella di impedire l'appaiamento nella replicazione del DNA formando appaiamenti errati con l'adenina; si verificherà perciò una transversione GC→TA nel successivo turno replicativo, a meno che non intervengano i sistemi di riparazione.

E' l'8-oxo-dGuo ad essere considerato uno dei biomarker più indicativi del danno al DNA e stress ossidativo<sup>137</sup> in molte matrici biologiche ed è per questo motivo che le analisi sono state svolte includendo questo specifico marker, anche se sono numerosi gli addotti del DNA che potrebbero comportarsi allo stesso modo.

<sup>135</sup> J. Cadet, H. Poulsen. Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA and urine. *Free Radic. Biol. Med.*, 48 (2010), pp. 1457-1459

<sup>136</sup> Barbieri A. (2009). Valutazione del danno da stress ossidativo come indicatore di effetto biologico dell'esposizione professionale a xenobiotici. Università di Bologna.

\*Convenzione Per La Conduzione Di Studio Clinico No Profit: "Le Nuove Sostanze Psicoattive Nella Dipendenza: Il Problema Nel Problema": 809/2019/OSS/AUSLPR; CE AVEN: 234/208/OSS/UNIPR, prot. 14092; 504/2019/OSS/UNIPR prot. 25512

<sup>137</sup> Dąbrowska N., W. A. (2017). Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin Exp Med*, 26(1), 155-166

L'analisi nei campioni urinari e salivari risulta facilitata per vari motivi: il metodo di raccolta non è invasivo, è rapido e di facile esecuzione, non richiedendo particolari accorgimenti; inoltre, non risulta produrre artefatti durante l'estrazione e l'8-oxodGuo presenta un'alta stabilità dal punto di vista chimico.

Biomarkers come 8-oxo-Gua e 8-oxo-dGuo, escreti in forma libera nelle urine rappresentano i maggiori prodotti di riparo del danno ossidativo al DNA in vivo, riparato verosimilmente attraverso il meccanismo del BER ed il sanamento del pool del precursore 2' deossiribonucleotide del DNA.

L'8-oxo-dGuo rilevabile in urina, a differenza di quello in saliva, è stato ampiamente studiato e usato come indicatore di stress ossidativo, mentre ancora pochi studi invece sono disponibili sull'8-oxo-Guo urinario. La determinazione di 8-oxo-dGuo e 8-oxo-Gua nelle urine può dare informazioni sul livello dello stress ossidativo presente nel corpo del singolo soggetto a livello sistemico.

Le concentrazioni ematiche di 8-oxo-dGuo sono correlabili direttamente all'esposizione a stress ossidativo e all'efficacia del conseguente riparo del DNA nell'intero organismo. Sebbene la maggior parte delle misurazioni dell'8-oxo-dGuo siano state realizzate in passato da saggi enzimatici come ELISA, ultimamente stanno prendendo piede tecniche più specifiche e sensibili come la spettrometria di massa per una determinazione più accurata e precisa di tali analisi<sup>138</sup>.

Tra i vari indicatori è stata dosata anche la cotinina, metabolita della nicotina, principale fattore di confondimento nella determinazione dei valori di riferimento delle sostanze analizzate<sup>139</sup> in quanto componente del fumo di tabacco, nota fonte di agenti ossidanti. Inoltre, grazie alla raccolta di informazioni su dati anamnestici, si andranno ad evidenziare possibili correlazioni con il tabagismo.

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando tecniche di statistica descrittiva e test T di student, tenendo conto di possibili differenze e correlazioni, come specificato nel relativo paragrafo.

## 5.2 Matrice biologica

Con *matrice biologica* si intende il tessuto o fluido biologico da cui è stato prelevato il campione da analizzare. Le matrici biologiche più utilizzate in questo campo sono il sangue, l'urina e recentemente la saliva. In questo studio ci concentreremo sulle ultime due citate.

<sup>138</sup> Hu, C-W., Cooke, M.S., Tsai Y., Chao, M.R. (2015). 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine concentrations in various human body fluids: implications for their measurement and interpretation. *Arch Toxicol* (2015) 89:201–210

<sup>139</sup> Andreoli R., Mutti A., Goldoni M., Manini P., Apostoli P., D. P. G. (2011). Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (2'-deoxy) ribonucleotides and nucleic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 50, 254–261.

In particolare, l'urina è stata valutata come la matrice biologica più idonea per la valutazione delle basi modificate, sia guanine ossidate che citosine metilate, e anche per gli indicatori di esposizione<sup>140,141</sup>. L'urina consente di analizzare sia le sostanze tal quali che i loro metaboliti dopo diversi giorni, tramite un prelievo non invasivo dei campioni con grandi volumi, minore manipolazione del campione e minore rischio di artefatti preanalitici rispetto al sangue ed altri campioni biologici.

Alcuni svantaggi riguardo l'urina come matrice biologica sono:

- la concentrazione variabile degli analiti può dipendere da fattori come età, sesso, fumo, ...
- in urina vi sono anche altre sostanze e metaboliti che potrebbero potenzialmente interferire nelle misurazioni;
- le concentrazioni urinarie delle basi modificate, pur essendo associate all'intensità del danno subito, possono essere ulteriormente influenzate dall'efficienza dei meccanismi di riparo, dalla probabile attivazione o inibizione degli stessi meccanismi, nonché della variabilità intra e interindividuale dei soggetti, con conseguente difficoltà nell'interpretazione del risultato.

### 5.3 RACCOLTA E STOCCAGGIO DEL CAMPIONE

La trattazione ed i risultati saranno presentati di seguito, suddividendo i paragrafi per matrice analizzata.

#### A) Analisi su matrice urinaria

Per questa parte dello studio sono stati reclutati i campioni provenienti da 39 soggetti di sesso sia maschile che femminile a disposizione del laboratorio di Tossicologia Forense dell'Istituto di Medicina Legale di Parma. Si tratta di soggetti deceduti (età minima 21 – età massima 70 anni) i cui campioni sono suddivisi in aliquote da 1 mL circa, conservate in freezer a -20 °C prima dell'analisi. Denota criterio di esclusione dallo studio la raccolta di campioni di urina non idonei, sia per quantità che possono risultare insufficienti sia per modalità confrontabili di cause di morte ed età fra i soggetti deceduti per overdose o altre cause di morte.

#### B) Analisi su matrice salivare

I campioni di matrice salivare sono stati raccolti da 66 volontari in cura presso il SerDP di Parma (età minima 18 – età massima 63 anni). A tutti i soggetti è stato esposto il progetto e le procedure per l'acquisizione dei campioni; previa firma dei consensi informati da parte dei candidati, è stato chiesto loro

<sup>140</sup> Andreoli R., Mutti A., Goldoni M., Manini P., Apostoli P., D. P. G. (2011). Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (2'-deoxy) ribonucleotides and nucleic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 50, 254–261.

<sup>141</sup> Hu C-W., Liu H-H., L. Y.-J. et al. (2012). Direct Analysis of 5-Methylcytosine and 5-Methyl-2'-deoxycytidine in Human Urine by Isotope Dilution LC-MS/MS: Correlations with N-Methylated Purines and Oxidized DNA Lesions. *Chem. Res. Toxicol.*, 25, 462–470.

di introdurre circa 2 mL di saliva all'interno di un apposito contenitore per materiale biologico. Sulla provetta è stato apposto un codice identificativo alfanumerico, in modo da garantire l'anonimato del campione prelevato.

Durante la raccolta del campione di fluido orale, sono state poste domande a scopo statistico-anamnestico, associando a queste il rispettivo codice identificativo, mantenendo pertanto l'anonimato e l'impossibilità di correlare le informazioni al proprietario del campione. Il campione è stato poi conservato a  $-18^{\circ}/-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi in appositi freezer.

## 5.4 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

### A) Analisi su matrice urinaria

I campioni di urina, dopo scongelamento, sono stati centrifugati a 12 000 rpm per 4 minuti e diluiti con una soluzione di HCOOH in acqua contenente la miscela degli standard interni (ISTD) secondo un rapporto 1:3 (30  $\mu\text{l}$  urina : 90  $\mu\text{l}$  di ISTD).

I campioni così preparati sono stati analizzati mediante cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) utilizzando un metodo analitico precedentemente validato presso il laboratorio di Tossicologia Industriale dell'Università di Parma che permette la determinazione simultanea dei seguenti indicatori: Guanina (Gua), 8-idrossi-7,8-diidroguanina (8-oxo-Gua), Guanosina (Guo), 8-idrossi-7,8-diidroguanosina (8-oxo-Guo), 2'deossiguanosina (dGuo), 8-idrossi-2'deossiguanosina (8-oxo-dGuo), 1-MetilGuanina (1-MeGua), 7-MetilGuanina (7MeGua), 7-metilGuanosina (7MeGuo), 5-MetilCitosina (5MeCyt), 5-MetilCitidina (5MeCyt), 5-Metil-2'deossiCitidina (5MedCyt), 5-IdrossiMetilCitosina (5OHMeCyt), 5-IdrossiMetil-2'deossiCitidina (5OHMedCyt), e Cotinina (COT) escreti in forma libera nelle urine.

### B) Analisi su matrice salivare

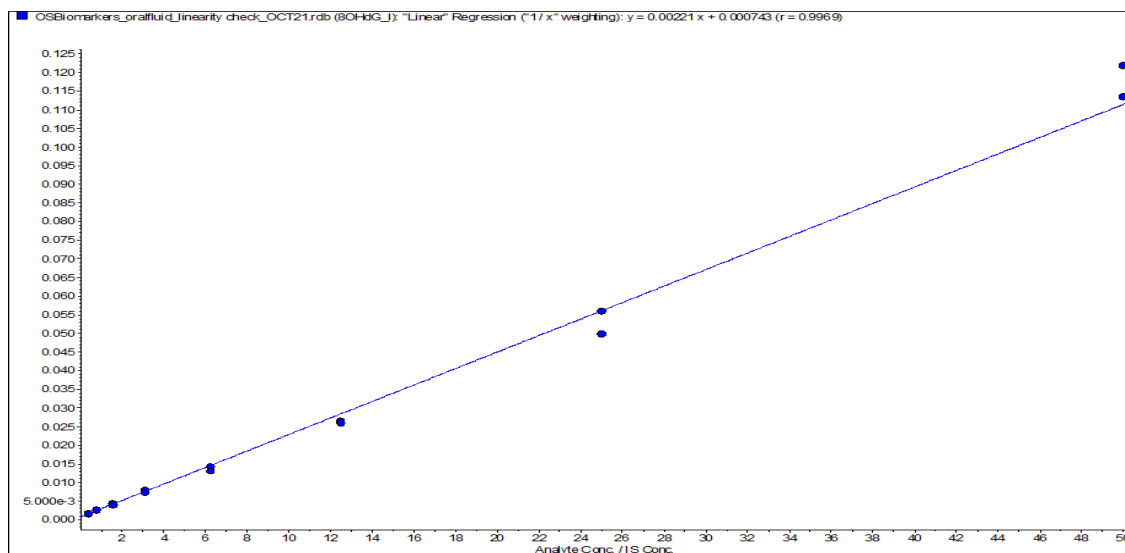
I campioni di saliva, analizzati con un metodo sviluppato per l'individuazione di biomarkers di stress ossidativi nei laboratori dell'azienda privata IRBM Spa, sono stati preventivamente centrifugati a 4500 rpm per 10 minuti e diluiti 1 a 1 con solvente acquoso addizionato di 1% HCOOH; la preparazione è basata su due estrazioni con cartucce per estrazione in fase solida (SPE Waters e Oasis), a partire da 200 microlitri di matrice biologica. La preparazione del campione avviene in modo automatico tramite strumentazione Hamilton, con la preparazione di 8 punti di curva di calibrazione (range dinamico 0.39 – 50 ng/mL) e 3 serie di quality controls a diverse concentrazioni (2, 25 e 50 ng/mL rispettivamente per low, medium e high concentrations).

Le condizioni strumentali sono le seguenti:

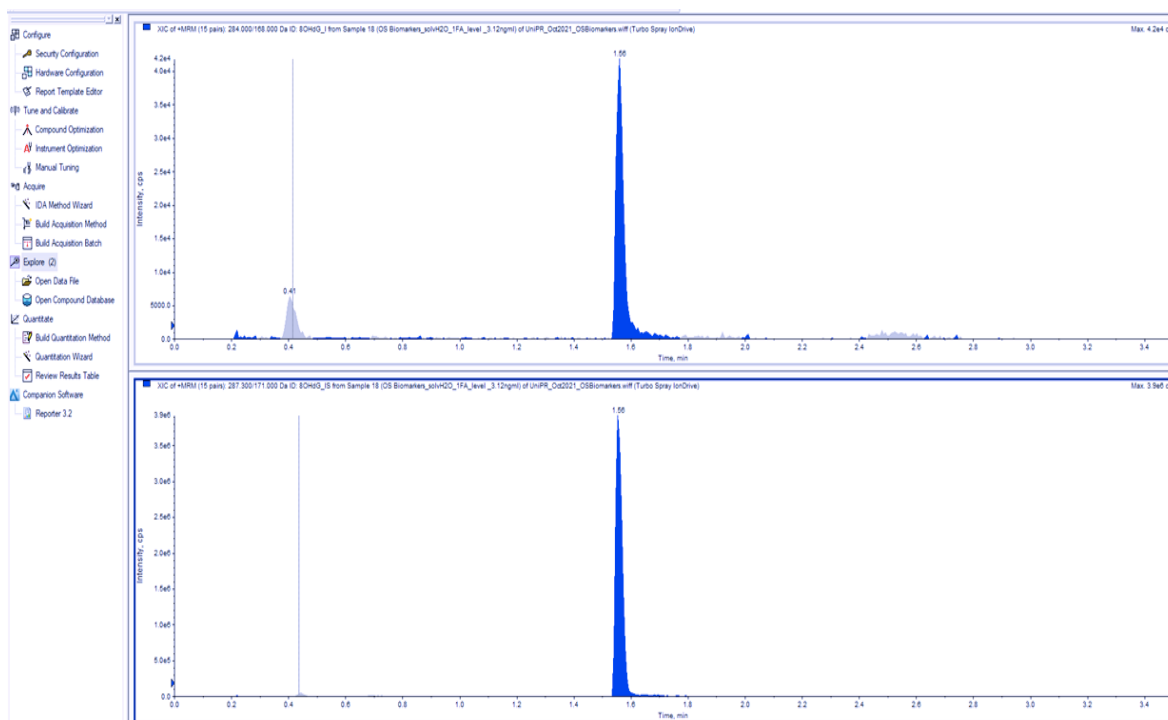
- cromatografo Waters Acquity I-Mass, spettrometro a triplo Quadrupolo API 6500 (ABSCIEX);
- colonna cromatografica HSS T3, 1.8 micron, 1.0x50.0mm (termostata a  $40^{\circ}\text{C}$ );

- fase mobile acquosa A composta da 0.1 % HCOOH e fase organica B ACN 0.1% HCOOH;
- 2 microlitri di volume di iniezione;
- flusso di 0.5 uL/min su strumentazione.

**Figura 5:** Curva di calibrazione per analisi 8-oxo-dGuo in matrice salivare ( $r^2$  0.9969, 8 livelli di concentrazione da 0.39 a 50 ng/mL).



**Figura 6:** Cromatogramma di 8-oxo-dGuo e del suo standard interno marcato in matrice salivare ad una concentrazione di 3.12 ng/mL.



## 5.5 SOSTANZE ANALIZZATE

Sono numerosi i prodotti derivanti dall'ossidazione delle basi puriniche e pirimidiniche, come la base modificata della guanina ossia l'8-idrossiguanina (8-OH-Gua) e il suo nucleoside ossidato 8-idrossi-2'deossiguanosina (8-OH-dGuo, vedi Figura 7)<sup>142</sup> già visto in precedenza.

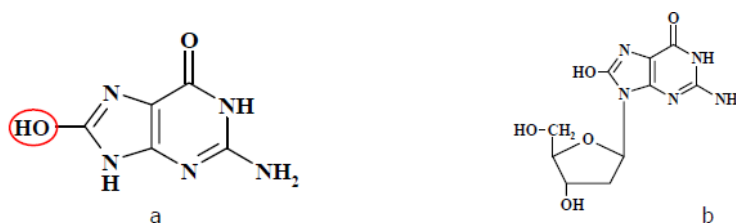


Figura 7: 8-idrossiguanina (a) e 8-idrossi-2'deossiguanosina (b)

La letteratura ha rivelato da tempo quale sia il potenziale mutagenico dell'8-OH-dGuo, ovvero la capacità di impedire il processo di appaiamento della replicazione del DNA.

In questo processo, l'8-OH-dGuo mutata forma appaiamenti errati con l'adenina (appaiamento particolarmente stabile data la formazione di 2 legami ad idrogeno) e, a meno che questo errore non venga corretto dai sistemi di riparazione, si verificherà una transversione GC→TA nel successivo turno replicativo.

Sono numerosi gli addotti al DNA che potrebbero comportarsi allo stesso modo, ma è l'8-oxo-dGuo ad essere considerato uno dei biomarker più indicativi del danno al DNA e stress ossidativo<sup>143</sup> in molte matrici biologiche.

In particolare, il dosaggio di questo biomarker nei campioni urinari e salivari risulta facilitato per vari motivi: il metodo di raccolta non è invasivo, è rapido e di facile esecuzione, non richiedendo particolari accorgimenti; inoltre, non risulta produrre artefatti durante l'estrazione e l'8-OH-dGuo presenta un'alta stabilità dal punto di vista chimico.

Tra gli altri prodotti di ossidazione risultati d'interesse si annovera l'8-OH-dGuo, ovvero la forma ossidata della guanina presente nell'RNA e che può derivare dal suo turnover<sup>144</sup>.

Per quanto attiene, invece, ai meccanismi di riparo dell'RNA ci sono ancora diversi studi da eseguire per poter caratterizzare appieno i loro meccanismi.

Ad oggi non sono molti i marcatori che rispecchiano tutte le caratteristiche elencate

<sup>142</sup> BARBIERI A. (2009). Valutazione del danno da stress ossidativo come indicatore di effetto biologico dell'esposizione professionale a xenobiotici. Università di Bologna.

<sup>143</sup> DĄBROWSKA N., W. A. (2017). Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin Exp Med*, 26(1), 155–166

<sup>144</sup> Biomarkers of Exposure, Effect and Susceptibility to Environmental and Occupational Chemicals. Manosij GHOSH, Radu CORNELIU DUCA, Frontiers Media SA, Frontiers in Public Health and Frontiers in Genetics.

precedentemente<sup>145</sup>. Gli indicatori più studiati in matrice urinaria sono tre derivati della guanina ossidata, prodotti principali del pool di acidi nucleici e nucleotidi generati dai ROS:

- 8-oxo-7,8-diidro-2'-deossiguanosina (8oxo-dGuo);
- 8-oxo-7,8-diidroguanosina (8-oxo-Guo);
- 8-oxo-7,8-diidroguanina (8-oxo-Gua).

Sono essenzialmente tre i fattori coinvolti nell'identificazione dei biomarkers nelle urine: i meccanismi di riparazione da cui dipendono, la loro efficacia e il ricambio di acidi nucleici.

Biomarkers come 8-oxo-Gua e 8-oxo-dGuo, escreti in forma libera nelle urine rappresentano i maggiori prodotti di riparo del danno ossidativo al DNA in vivo, riparato verosimilmente attraverso il meccanismo del BER ed il sanamento del pool del precursore 2' deossiribonucleotide del DNA.

L'8-oxo-dGuo rilevabile in urina, a differenza di quello in saliva, è stato ampiamente studiato e usato come indicatore di stress ossidativo, mentre ancora pochi studi invece sono disponibili sull'8-oxo-Guo urinario. La determinazione di 8-oxo-dGuo e 8-oxo-Gua nelle urine può dare informazioni sul livello dello stress ossidativo presente nel corpo del singolo soggetto a livello sistemico.

Le concentrazioni ematiche di 8-oxo-dGuo sono correlabili direttamente all'esposizione a sostanze o di una condizione anomala che induce uno squilibrio tra ossidanti e antiossidanti e all'efficacia del conseguente riparo del DNA nell'intero organismo. Sebbene la maggior parte delle misurazioni dell'8-oxo-dGuo siano state realizzate in passato da saggi enzimatici come ELISA, ultimamente stanno prendendo piede tecniche più specifiche e sensibili come la spettrometria di massa per una determinazione più accurata e precisa di tali analisi<sup>146</sup>.

I livelli urinari forniscono, dunque, la misura dello stato di stress ossidativo nell'intero corpo e le loro quantità rappresentano il livello medio di ossidazione di DNA e RNA, tenendo in considerazione l'intensità di esposizione ai diversi agenti ossidanti, l'efficienza dei meccanismi di riparazione e le differenze individuali.

In particolare, l'8-oxo-dGuo è la forma ossidata del nucleoside deossiguanosina, composta da guanina e deossiribosio<sup>147</sup>.

Successivamente al processo di riparazione in vivo del DNA e - soprattutto - in seguito alla degradazione degli acidi nucleici, l'8-oxo-dGuo viene liberata e secreta nelle urine sia come base singola

<sup>145</sup> FRANZINI M., FORNACIARI I., FIERABRACCI V., SUPERIORE S., ANNA S., SPERIMENTALE P., & MEDICHE B. (2009). Indici di laboratorio di stress ossidativo. *LigandAssay*, 14(2)

<sup>146</sup> HU C-W., COOKE M.S., TSAI Y., CHAO, M.R.(2015). 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine concentrations in various human body fluids: implications for their measurement and interpretation. *Arch Toxicol* (2015) 89:201–210

<sup>147</sup> PROTANO C., ANDREOLI R., MUTTI A., PETTI S., & VITALI M. (2014). Biomarkers of oxidative stress to nucleic acids: Background levels and effects of body mass index and life style factors in an urban paediatric population. *Science of the Total Environment*, 500 501, 44 51.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.095.



sia inclusa in oligomeri di DNA senza aver subito ulteriori modifiche. Esso è considerato uno dei biomarker più stabili e specifici per valutare il livello di stress ossidativo sistemico<sup>148</sup>.

Infatti, l'8-oxo-dGuo può derivare dalla riparazione della 2'-deossiguanosina trifosfato ossidata nel pool cellulare di 2'-deossiribonucleotide derivante da *MTH1* o dalla riparazione di 8-oxo-dGuo nel DNA da parte di una endonucleasi o dal sistema NER.

L'8-oxo-Guo è invece il risultato del legame tra la guanina e ribosio e deriva dal turnover o dal riparo di una guanina ossidata nell'RNA, anche se questi meccanismi di riparo dell'RNA sono ancora oggetto di studio.

L'8-oxo-Gua, la forma ossidata della guanina, può derivare sia dall'azione BER su residui di guanina ossidata nel DNA da parte di specifici enzimi (glicosilasi) sia dal turnover e/o degradazione dell'RNA. E' quindi possibile determinare nelle urine le relative forme ossidate o metilate libere o coniugate con il ribosio anche dell'RNA o il pool dei nucleotidi soggetti a danno ossidativo o ad errori di metilazione.

La complessità nell'identificare e quantificare gli indicatori di danno ossidativo nei fluidi biologici dipende da diversi fattori: in primo luogo, i prodotti ottenuti dopo attacco dei ROS sulle macromolecole biologiche sono numerosi e spesso presenti a basse concentrazioni, tali da richiedere l'impiego di strumentazione analitica ad alte prestazioni; in secondo luogo, più indicatori possono derivare da un'unica molecola bersaglio a seconda dei differenti meccanismi di riparo; inoltre, in un primo stadio dell'insorgenza della malattia lo stato di stress ossidativo è un meccanismo dinamico e reversibile.

In passato, gli studi condotti venivano effettuati estraendo il DNA da campioni ematici o da biopsie tissutali, ma le informazioni ottenute mediante queste analisi erano unicamente sul danno ossidativo o di iper- e ipo-metilazione, riguardanti esclusivamente il DNA. Ultimamente, invece, fra le matrici biologiche disponibili, l'urina ha attratto crescente attenzione come matrice più idonea per la valutazione delle basi modificate, siano esse guanine ossidate che citosine metilate<sup>149,150</sup>, poiché con tale matrice la preparazione del campione può essere svolta con minima manipolazione e la riduzione del rischio di artefatti pre-analitici rispetto al sangue e ad altri tessuti è notevolmente ridotta. Inoltre, consente un'analisi completa dei possibili danni agli acidi nucleici e al pool dei nucleotidi, non quindi circoscritta al solo DNA. La matrice urinaria è comunque una matrice biologica complessa, ricca anche di altre sostanze e metaboliti che possono interferire nelle analisi. Le concentrazioni urinarie delle basi modificate, pur essendo associate all'intensità del danno subito, risentono dell'efficienza dei meccanismi

<sup>148</sup> FRANZINI M., FORNACIARI I., FIERABRACCI V., SUPERIORE S., ANNA S., SPERIMENTALE P., & MEDICHE B. (2009). Indici di laboratorio di stress ossidativo. *LigandAssay*, 14(2).

<sup>149</sup> ANDREOLI R., MUTTI A., GOLDONI M., MANINI P., APOSTOLI P., D. P. G. (2011). Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (deoxy) ribonucleotides and nucleic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 50, 254-261.

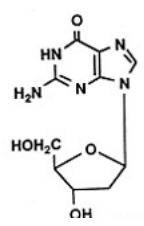
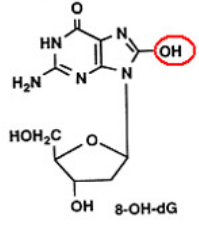
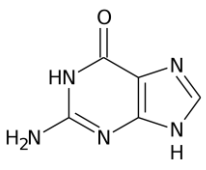
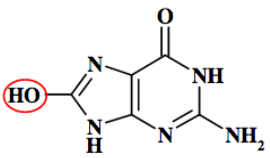
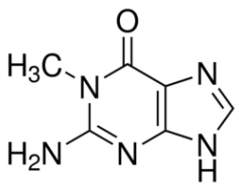
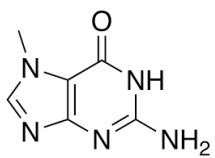
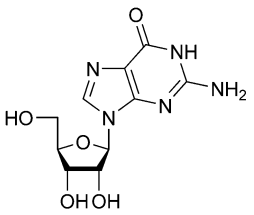
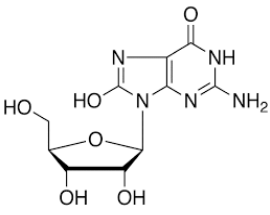
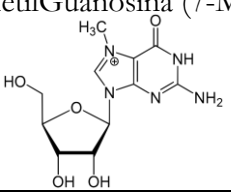
<sup>150</sup> HU C W., LIU H. H., L. J. et al. (2012). Direct Analysis of 5 Methylcytosine and 5 Methyl deoxycytidine in Human Urine by Isotope Dilution LC MS/MS: Correlations with N Methylated Purines and Oxidized DNA Lesions. *Chem. Res. Toxicol.*, 25, 462-470.

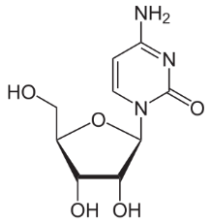
di riparo, da possibili attivazione o inibizione degli stessi, nonché dalla variabilità interindividuale dei soggetti reclutati per lo studio, rendendo quindi talvolta l'interpretazione dei risultati complicata.

Inoltre, basi metilate come l'1-MetilGuanina (1-MeGua), la 7-MetilGuanina (7-MeGua) e la 5-Metilcitosina, (5-MeCyto) e le forme omologhe contenenti il deossiribosio, escrete in forma libera nelle urine, sono tra i prodotti dosabili generati da questi meccanismi di riparazione e dal normale turnover cellulare. E' dunque diventato sempre più importante stabilire degli intervalli di riferimento per una corretta interpretazione di questi composti sia nelle analisi cliniche di malattie che come indicatori per il monitoraggio degli effetti precoci degli agenti ossidanti<sup>151</sup>. E' possibile determinare i livelli di concentrazione di alcune forme metilate dell'RNA come la 7-MeGuo e la 5-Metilcitosina, (5-MeCyt), escreti in forma libera nelle urine, anche se non è ancora noto se queste derivino dal normale turnover dell'RNA e/o da specifici sistemi di riparazione dello stesso. Ad esempio, la quantificazione del biomarker 7-MeGua nelle urine rappresenta un parametro utile per lo studio del danno al DNA indotto da agenti metilanti. La 7-meGua è correlata fortemente al danno al DNA causato da nitrosamine presenti nel fumo di tabacco e di altri agenti di metilazione come il metil bromuro presente sia come composto di sintesi che in natura prodotto da piante della famiglia delle Crucifere. E' inoltre possibile che la 7-meGua si formi nel DNA cellulare tramite l'azione di S-adenosilmetionina, ma può anche essere prodotto dalla degradazione dell'RNA ("marker del tasso metabolico"). I livelli urinari di questo indicatore sembrano essere associati anche all'età, peso e assunzione di particolari cibi ad alto contenuto proteico, data la metilazione sul DNA provocata dai composti nitrosi derivanti dal consumo di questi cibi. Anche l'adenosina (Ado) figura tra gli analiti ricercati in questo studio, insieme alla sua forma ossidata deossiadenosina (dAdo); l'adenosina o (9-β-D-ribofuranosiladenina) è una molecola endogena, antinfiammatoria, prodotta in seguito a morte cellulare dopo la degradazione di adenosina trifosfato (ATP) mediante specifici enzimi; essa è in grado di spegnere l'infiammazione e indurre i necessari processi di riparazione dei tessuti danneggiati; un'alterazione di Ado o dAdo - o del loro rapporto - indicherebbe perciò una ridotta capacità dei processi di riparazione.

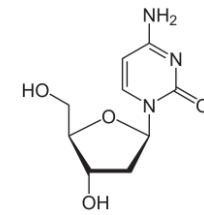
Nello specifico, i biomarker oggetto di studio nella matrice urinaria sono i seguenti:

<sup>151</sup> PROTANO C., ANDREOLI R., MUTTI A., PETTI S., & VITALI M. (2014). Biomarkers of oxidative stress to nucleic acids: Background levels and effects of body mass index and life-style factors in an urban paediatric population. *Science of the Total Environment*, 500–501, 44–51. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.095.

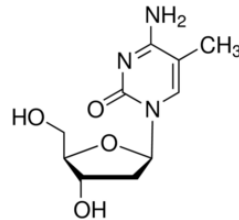
Forma nativa	Forma ossidata/metilata
<p>2'-deossiguanosina (dGuo)</p> 	<p>8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-oxo-dGuo)</p> 
<p>Guanina (Gua)</p> 	<p>8-idrossi-guanina (8-oxo-Gua)</p>  <p>1-MetilGuanina (1-MeGua)</p>  <p>7-MetilGuanina (7-MeGua)</p> 
<p>Guanosina (Guo)</p> 	<p>8-idrossi-guanosina (8-oxoGuo)</p>  <p>7-metilGuanosina (7-MeGuo)</p> 
<p>Citidina (Cyt)</p>	<p>Deossicitidina (dCyt)</p>



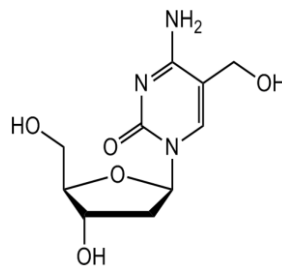
5-metilteossicitidina (5-MedCyt)



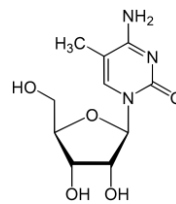
5-idrossimetildeossicitidina (5-OHMedCyt)



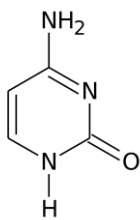
5-metilcitidina (5-MeCyt)



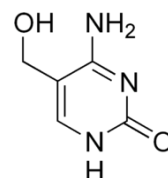
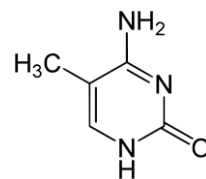
5-metilcitosina (5-MeCyt)

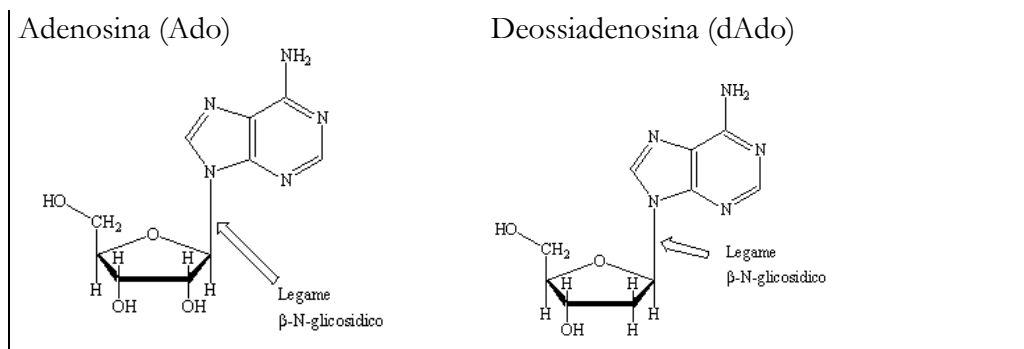


Citosina (Cyt)



5-idrossimetilcitosina (5-OHMeCyt)





## 5.6 CREATININA

La creatina è prodotta principalmente dal fegato e trasportata successivamente nei muscoli, dove viene usata come fonte di energia per l'attività muscolare; parte della creatina viene poi degradata e convertita in creatinina. Queste quantità dipendono proporzionalmente dalla massa muscolare, per cui negli uomini si riscontrano valori più elevati rispetto alle donne. I valori di riferimento nel plasma per una popolazione adulta sono: 0,8-1,3 mg/dl (uomini) e 0,6-1,1, mg/dl (donne).

La creatinina viene interamente smaltita dai reni ed è considerato un utile marcatore della velocità di filtrazione glomerulare (GFR), ma anche un parametro associabile alla concentrazione dell'urina stessa. Pertanto, il dosaggio della creatinina fornisce informazioni importanti sull'efficienza della funzionalità renale, gli organi deputati al filtraggio del sangue.

La concentrazione ematica di questa sostanza aumenta quando diminuisce la GFR, ad esempio nel caso di malattie croniche dei reni o di lesioni acute ai reni. Il livello della creatinina può invece aumentare quando il soggetto è fortemente disidratato o è in shock ipovolemico, oppure se fa un eccessivo consumo di proteine (ad es. carne rossa).

In generale, l'intervallo fisiologico è attorno a 0,3-3 g/l. Valori superiori a 3 g/l suggeriscono alterata funzionalità renale con conseguente concentrazione ematica elevata di creatinina<sup>152</sup>.

## 5.7 DETERMINAZIONE DEGLI INDICATORI DI STRESS OSSIDATIVO e DI METILAZIONE DEGLI ACIDI NUCLEICI URINARI MEDIANTE HPLC-MS/MS

L'analisi dei campioni è stata condotta con il sistema UPLC ExionLC (Sciex) accoppiato a uno spettrometro di massa ibrido a triplo quadrupolo API 4000 (ABSciex) e dotato di una interfaccia Turbo Ion Spray per la ionizzazione electrospray (ESI).

Le condizioni strumentali sono le seguenti:

- colonna Atlantis dC18 (100 x 3,0 mm i.d., 3µm, Waters) per separare gli analiti;

<sup>152</sup> GINDRO (2016). Creatinina nel sangue: alta, bassa e valori normali. <https://www.valorinormali.com/sangue/creatinina/>

- una fase mobile A costituita da acido formico 10 mM (pH 3.75) e una fase mobile B costituita da metanolo in gradiente di eluizione;
- il flusso della fase mobile è di 200  $\mu\text{l}/\text{min}$  ;
- il volume di iniezione è di 5  $\mu\text{l}$ .

Per quanto riguarda le basi ossidate e metilate e della cotinina, l'acquisizione in MS/MS è stata ottenuta in ionizzazione positiva ed in modalità SRM (*selected reaction monitoring*). Sono state monitorate le transizioni caratteristiche di ciascun metabolita dei composti studiati e dei rispettivi omologhi marcati isotopicamente (utilizzati come standard interni). In Tabella 1 si riportano le transizioni monitorate, i tempi di ritenzione e gli intervalli di concentrazioni utilizzate per la quantificazione di ciascun analita e del relativo ISTD; nelle figure da 8 a 15 sono riportati cromatogrammi e rette di taratura di alcuni analiti. Gli standard interni utilizzati sono i seguenti: [ $^{13}\text{C}1,^{15}\text{N}2$ ] 8-idrossi-7,8-diidroGuanina ([ $^{13}\text{C}1,^{15}\text{N}2$ ] 8-oxoGua), [ $^{15}\text{N}5$ ] Guanosina ([ $^{15}\text{N}5$ ] Guo), [ $^{15}\text{N}5$ ] 8-idrossi-7,8-diidroGuanosina ([ $^{15}\text{N}5$ ]8-oxo-Guo), [ $^{15}\text{N}5$ ] 2'deossiGuanosina ([ $^{15}\text{N}5$ ]dGuo), [ $^{15}\text{N}5$ ] 8-idrossi-2'deossiGuanosina ([ $^{15}\text{N}5$ ]dGuo), [ $^{13}\text{C}1,^{15}\text{N}2$ ] Citosina ([ $^{13}\text{C}1,^{15}\text{N}2$ ]Cyto), [ $^{13}\text{C}5$ ]Citidina ([ $^{13}\text{C}5$ ]Cyt), 5-Metil-2'deossiCitidinad3 (5-MedCyt-d3) e Cotinine-d3 (Cot-d3).

8-idrossi-7,8-diidroGuanosina ([ $^{15}\text{N}5$ ] 8-oxo-Guo) e 8-idrossi-2'deossiGuanosina ([ $^{15}\text{N}5$ ]8-dGuo) sono stati ottenuti per sintesi dalle rispettive forme non ossidate e marcate isotopicamente.

**Tabella 1.** Analiti, transizioni SRM, tempo di ritenzione e relativi standard interni, range di concentrazione nel metodo per le analisi in matrice urinaria

Composto	Transizione ( <i>m/z</i> )	Tr (min)	Range (nM)	IS	Transizione ( <i>m/z</i> )
----------	-------------------------------	-------------	---------------	----	-------------------------------

1-MeGua	166→135	6.9	0-800	[13C1]Gua	153→111
7-MeGua	166→149	7.2	0-30000	[13C1]Gua	153→111
7-MeGuo	298→166	6.9	0-240		
Cyto	112→69	1.5	0-15000	[13C1,15N2]Cyto	115→70
5-MeCyto	126→83	2.1	0-2000		
Cyt	244→112	2.9	0-5000	[13C5]Cyt	249→112
5-MeCyt	258→126	5.2	0-250		
dCyt	228→112	3.9	0-80		
5-MedCyt	242→126	7.4	0-200	5-MedCyt-d3	245→129
5-OHMedCyt	258→142	4.4	0-200		
5-OHMeCyto	141.9→124	1.9	0-2000		
Gua	152→135	3.5	0-7500	[13C1]Gua	153→111
8-oxoGua	168→140	4.5	0-4500	[13C1,15N2] 8-oxoGua	153→111
Guo	284→152	11.4	0-500	[15N5] Guo	289→157
8-oxoGuo	300→168	13.9	0-250	[15N5] 8-oxoGuo	305→173
dGuo	268→152	12.5	0-80	[15N5] dGuo	273→157
8-oxodGuo	284→168	14.1	0-80	[15N5] 8-oxodGuo	289→173
COT	177→80	13.2	0-200	Cot-d3	180→101

**Legenda:** 1-MeGua, 1-MetilGuanina; 7-MeGua, 7-MetilGuanina; 7-MeGuo, 7-MetilGuanosina; Cyto, Citosina; 5-MeCyto, 5-MetilCitosina; Cyt, Citidina; 5-MeCyt, 5-MetilCitidina; dCyt, 2'deossiCitidina; 5-MedCyt, 5-Metil-2'deossiCitidina; 5-OHMedCyt, 5-idrossi-5-Metil-2'deossiCitidina; 5-OHMeCyto, 5-idrossi-5-MetilCitosina; Gua, Guanina; 8-oxoGua, 8-idrossiGuanina; Guo, Guanosina; 8-oxoGuo, 8-idrossiGuanosina; dGuo, 2'deossiGuanosina; 8-oxodGuo, 8-idrossi-2'deossiGuanosina; e COT, Cotinina.

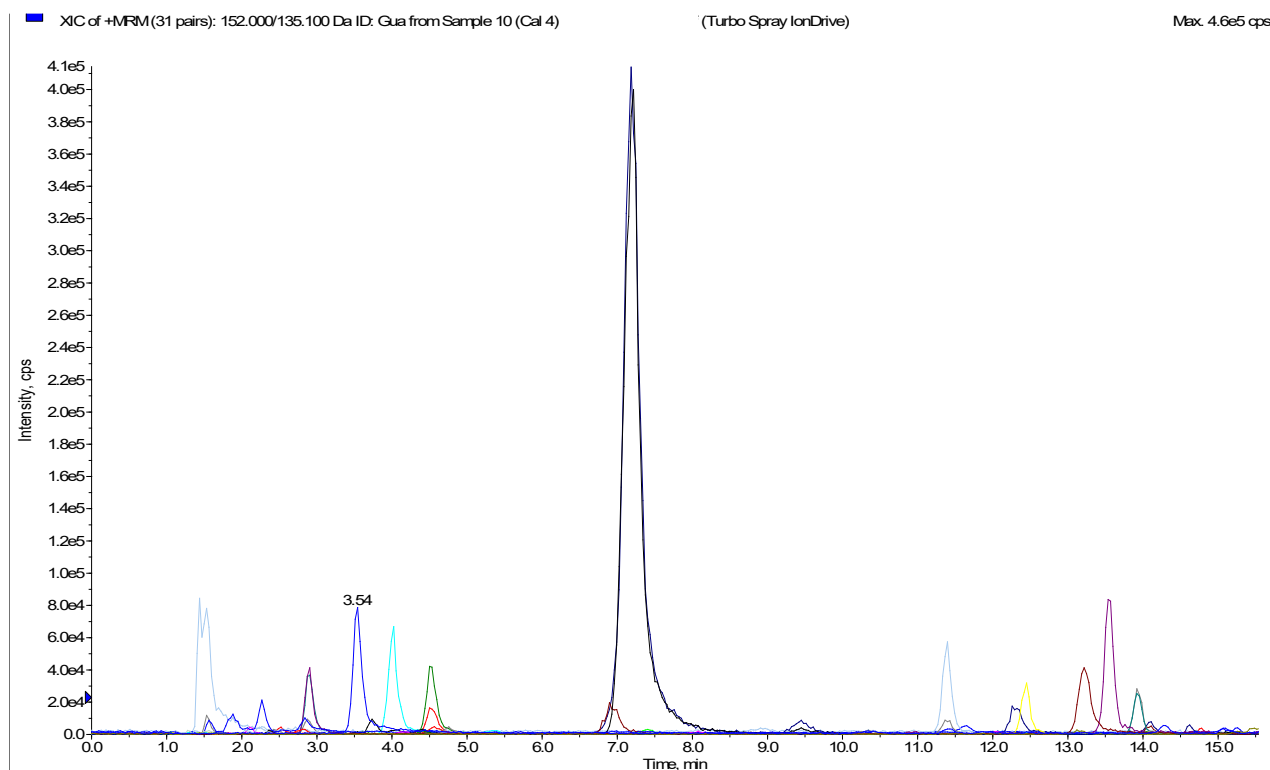


Figura 8. Total Ion Chromatogram (TIC) degli analiti in tabella 1 in urina

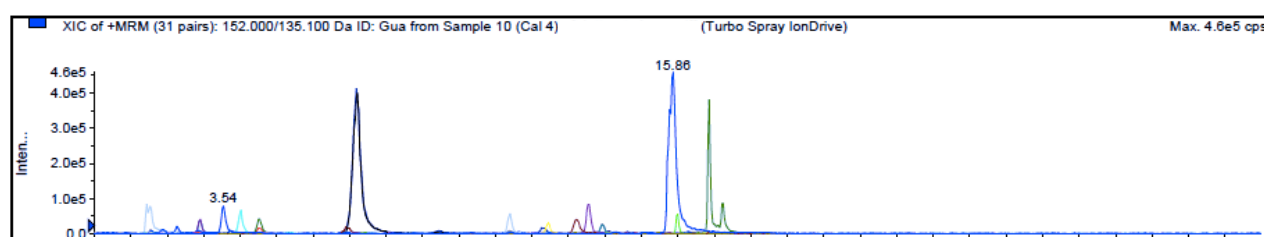


Figura 9. Extracted Ion Chromatogram (EIC) di Guo (tr: 11.39 min.) e [15N5]Guo (tr: 11.37 min.) in urina

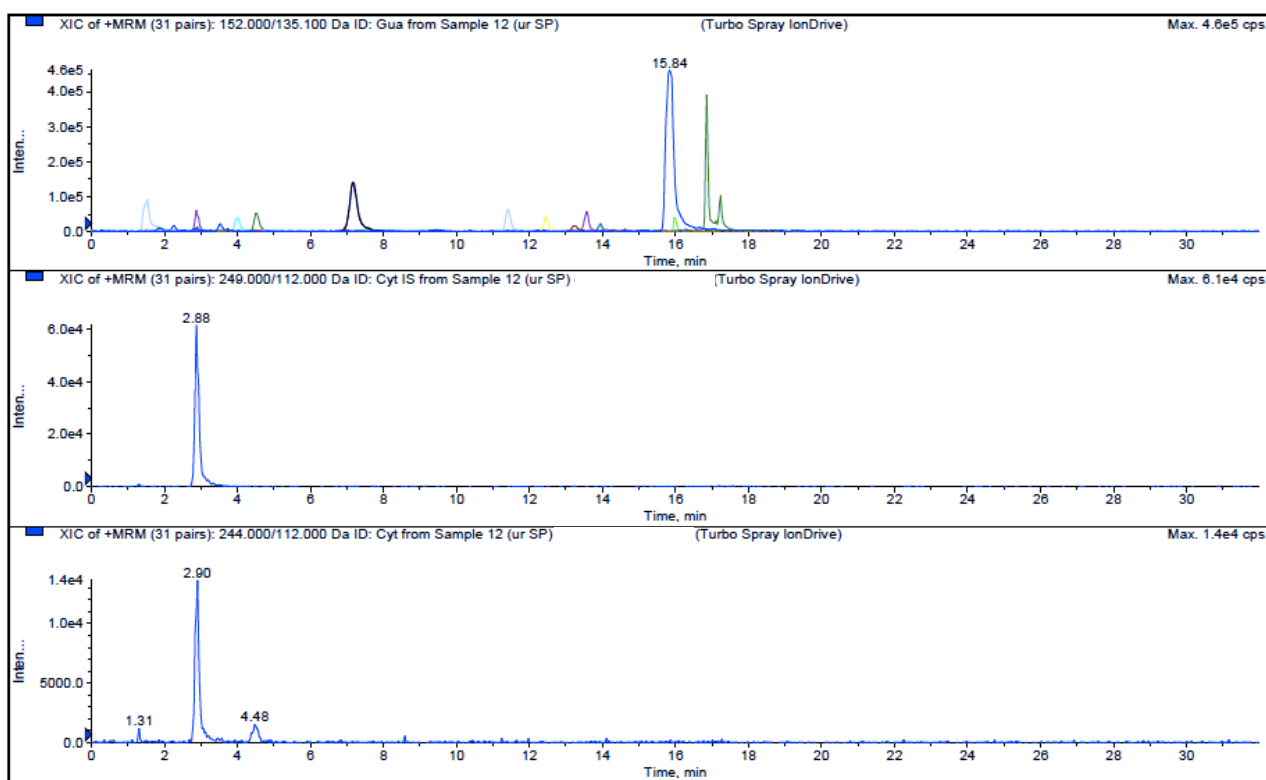


Figura 10. Extracted Ion Chromatogram (EIC) di Cyt (tr: 2.90 min.) e di [13C5]Cyt (tr: 2.88 min.) in urina

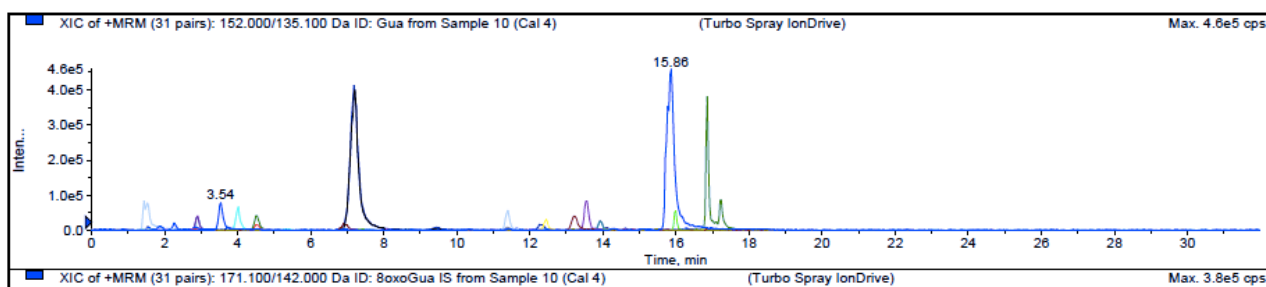




Figura 11. Extracted Ion Chromatogram (EIC) di 8oxoGua (tr: 4.51 min.) e [13C1,15N2] 8-oxoGua (tr: 4.52 min.) in urina

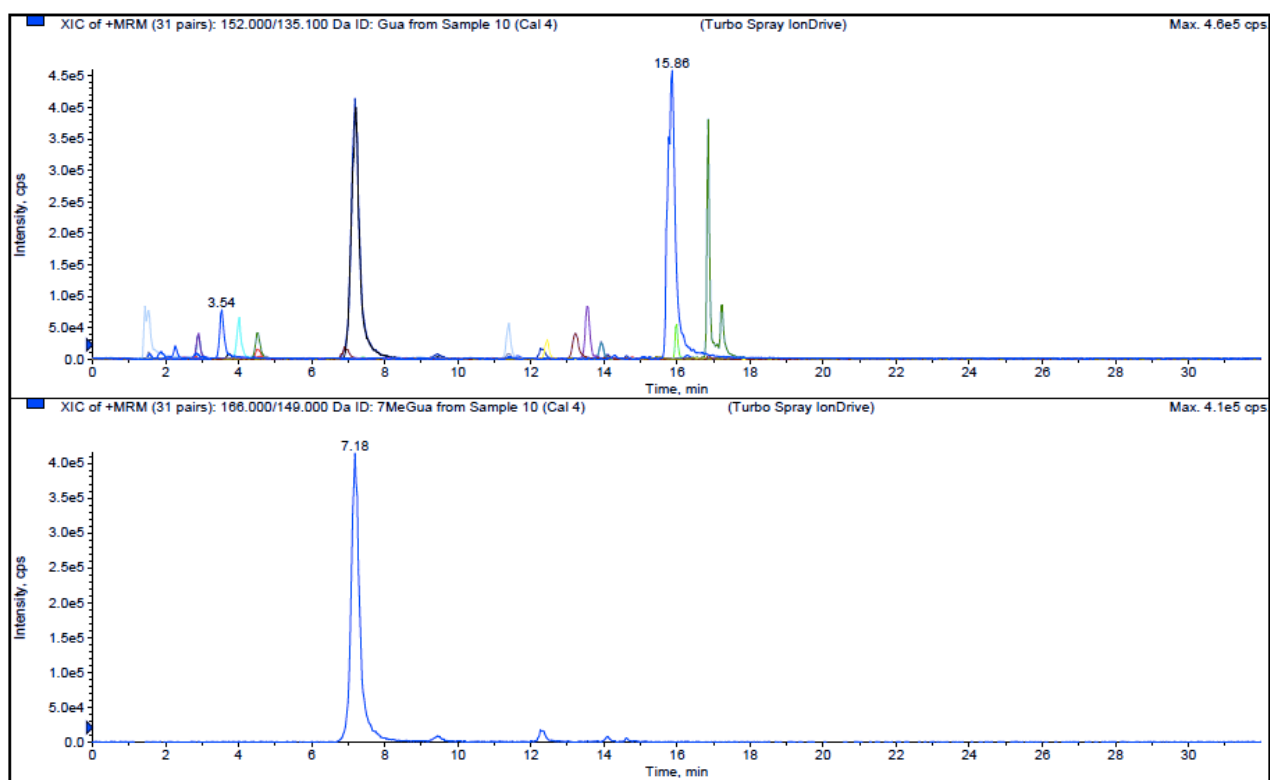
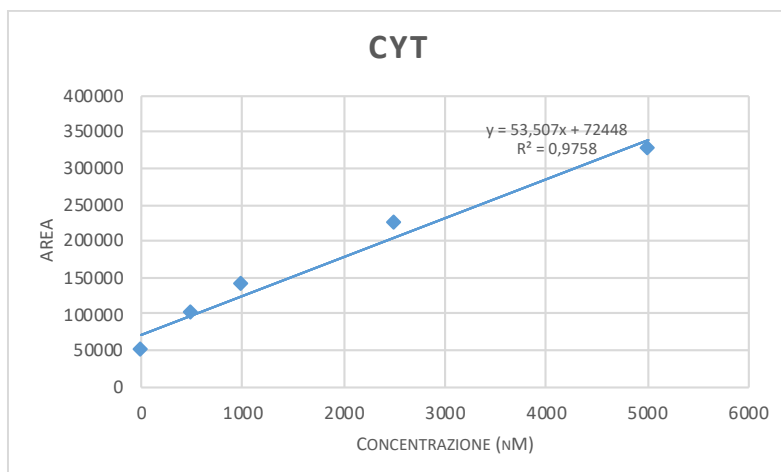
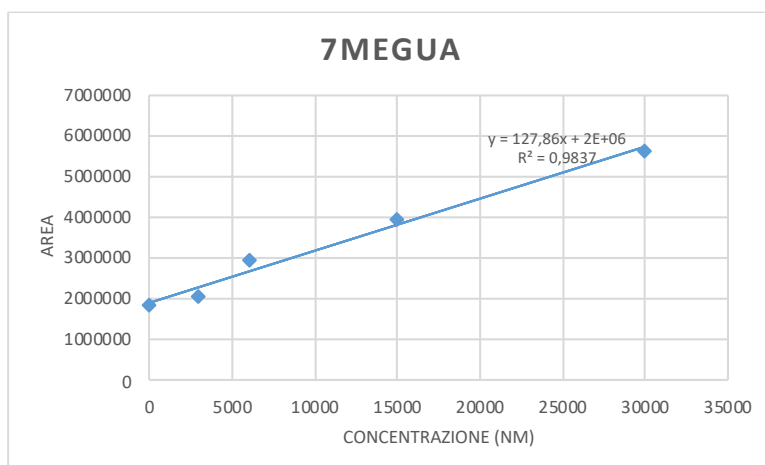


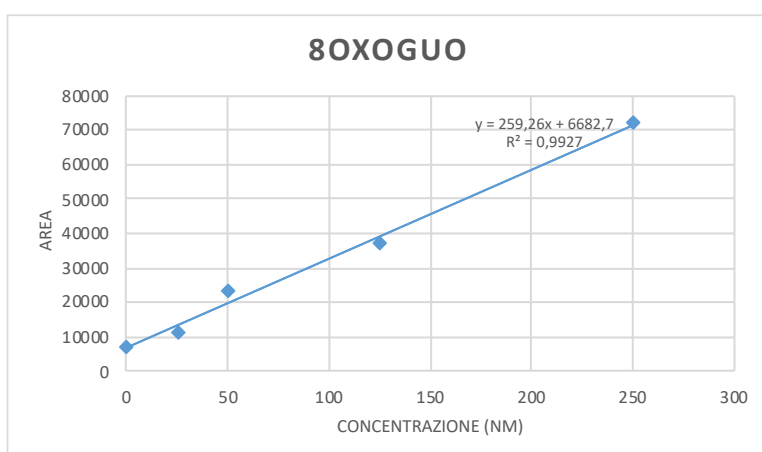
Figura 12. Extracted Ion Chromatogram (EIC) di 7MeGua (tr: 7.18 min.) in urina



**Figura 13.** Retta di taratura di Cyt (range: 0-5000 nM) in urina



**Figura 14.** Retta di taratura di 7-MeGua (range: 0-30000 nM) in urina



**Figura 15.** Retta di taratura di 8-oxoGuo (range: 0-250 nM) in urina

## 5.8 DOSAGGIO DELLA CREATININA

L'analisi della creatinina è stata effettuata mediante il metodo di Jaffé, utilizzando uno strumento di chimica clinica (quantiILab) presso il laboratorio di Tossicologia Industriale dell'Università di Parma. Il metodo di Jaffé è un saggio colorimetrico che prevede la reazione tra creatinina e acido picrico in condizioni alcaline.

## 5.9 ANALISI STATISTICHE

Tutte le analisi statistiche su entrambe le matrici biologiche analizzate sono state eseguite utilizzando SPSS versione 26.0 (IBM, Armonk, NY, USA) e GraphPad Prism versione 8.0 (San Diego, CA, USA). La distribuzione dei dati è stata analizzata utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov e mediante ispezione visiva degli istogrammi dei dati e dei grafici Q-Q. I dati categorici sono stati analizzati utilizzando il test chi-quadrato e il test esatto di Fisher, in base alle ipotesi sulla dimensione del campione. I dati numerici parametrici sono stati analizzati utilizzando il test t di Student e i dati non parametrici sono stati analizzati con il test U di Mann-Whitney. Le associazioni tra età e i diversi analiti sono state eseguite utilizzando le correlazioni classificate di Spearman. Sono state utilizzate anche l'analisi della varianza a una via (ANOVA) e l'analisi della covarianza (ANCOVA) aggiustata per l'età. La correzione per confronti multipli riguardanti il tasso di false scoperte (FDR, false discovery rate) è stata eseguita utilizzando la procedura Benjamini-Hochberg. I valori di p corretti inferiori a 0,05 sono stati considerati statisticamente corretti.

## CAPITOLO VI - Risultati e Discussione

## 6.1 ANALISI SU MATRICE URINARIA

Le analisi in urina sui campioni utilizzati per la quantificazione dei biomarkers tramite spettrometria di massa hanno fornito i risultati mostrati nelle tabelle 2a e 2b. Sono riportati i dati anamnestici (sesso, età, cause di morte, presa in carico al SerD.P e informazioni sulle sostanze d'abuso) e le concentrazioni ritrovate degli analiti oggetto di studio (riportati in grammi per litro g/L, nanomolare nM o millimolare mM per la creatinina). I soggetti da 1 a 26 rappresentano i campioni biologici dei casi presi in esame (soggetti deceduti risultati positivi al test di conferma per le droghe d'abuso e/o in cura presso il SerDP al momento del decesso), mentre i soggetti numerati da 27 a 39 rappresentano i casi controllo (soggetti le cui analisi per le droghe d'abuso hanno fornito esito negativo).

**Tabella 2a:** Tabella riassuntiva con informazioni anamnestiche dei soggetti coinvolti nell'analisi delle urine (concentrazioni espresse in grammi per litro g/L e millimoli mM)

ID	Sex	Age	Info	Cause of Death	Creatinina g/L	Creatinina mM	SerDP
1	M	45	Benzodiazepines, Cocaine, Morphine	cardiogenic shock	0,08	0,71	yes
2	M	39	Methadone, Cocaine	brain injuries	0,06	0,53	yes
3	M	48	Morphine, Cocaine	brain injuries	1,60	14,16	no
4	F	24	Amphetamines, Cocaine, THC, MDMA	hemorrhagic shock	0,25	2,21	no
5	M	27	Morphine, THC	overdose	0,32	2,83	no
6	M	39	Methadone, Cocaine	overdose	0,32	2,83	yes
7	M	46	Benzodiazepines, Morphine	cardiogenic shock	0,15	1,33	yes
8	M	46	Methadone, Cocaine, Benzodiazepines	overdose	0,16	1,42	no
9	M	48	Morphine, Cocaine, THC	overdose	2,31	20,44	yes
10	M	43	Morphine, Cocaine, Benzodiazepines	overdose	0,73	6,46	yes
11	M	24	none	overdose	0,15	1,33	yes
12	M	44	Morphine, Cocaine	overdose	0,30	2,65	no
13	M	48	Metadone, Benzodiazepines	overdose	0,34	3,01	no
14	M	29	Morphine, Cocaine	overdose	0,84	7,43	no
15	F	30	Methadone, Cocaine, THC, Oxycodone	cardiogenic shock	0,86	7,61	yes
16	M	21	Morphine, Cocaine	overdose	1,43	12,65	yes
17	F	37	Morphine, THC	overdose	0,30	2,65	no
18	M	62	Morphine	overdose	0,15	1,33	yes
19	M	24	Methadone	overdose	1,00	8,85	no
20	M	35	Methadone	overdose	0,25	0,18	yes
21	M	45	THC	overdose	0,46	2,21	yes
22	M	60	Benzodiazepines	overdose	0,50	4,07	no
23	M	43	Methadone, Benzodiazepines	overdose	0,16	4,42	no
24	M	35	Methadone, Benzodiazepines	overdose	0,25	1,42	no
25	M	19	THC	traumatic shock	0,54	2,21	yes
26	M	31	Cocaine	overdose	0,10	4,78	no
27	M	70	none	brain hemorrhage	0,72	0,88	no
28	M	74	none	overdose *	0,20	6,37	no
29	F	63	none	hemorrhagic shock	0,58	1,77	no
30	M	59	none	traumatic shock	1,56	5,13	no
31	M	52	none	not dead	1,17	13,81	no
32	M	54	none		0,94	10,35	no
33	M	57	none		0,79	8,32	no
34	M	56	none		0,96	6,99	no
35	M	46	none		1,40	8,50	no
36	M	59	none		1,31	12,39	no
37	M	50	none		0,51	11,59	no
38	M	53	none		1,30	4,51	no
39	M	52	none		0,50	11,50	no

\*in seguito a farmaci, negativo per sostanze d'abuso

Non sono presenti in letteratura valori di riferimento dei biomarkers ivi studiati relativi a persone decedute, perciò per poter fare dei paragoni utili alla discussione dei risultati, sono stati utilizzati i valori della mediana ottenuti dalle analisi dei campioni controllo, ovvero quei soggetti i cui campioni biologici e la storia clinico-anamnestica non evidenziano un pregresso uso o abuso di alcuna sostanza stupefacente, come riportato dai dati presenti negli archivi. Inoltre, è stato eseguito un controllo preventivo ulteriore al fine di evidenziare differenze tra i marcatori quantificati nei campioni provenienti da matrice urinaria di soggetti nel gruppo di controllo (soggetti da 27-30 e 31-39), ma tale confronto ha fornito esito negativo, dimostrando che i valori tra le sottopopolazioni sono paragonabili.

**Tabella 2b:** Risultati espressi in nanomoli (nM) dei biomarkers e della cotinina nei campioni di urina

ID	GUANINA 8 oxoguanina				CITOSINA			CITIDINA deossi citidina					deossi		GUANOSINA				ADENOSINA ossiadenosil			COTININA
	Gua_nM	8oxoGua_nM	7mega_nM	1mega_nM	Cyto_nM	5MeCyto_nM	5OHmcyto_nM	Cyt_nM	5MeCyt_nM	dcyt_nM	5medcyt_nM	5OHmedcyt_nM	guo_nM	8guo_nM	8dGuo_nM	dGuo_nM	ado_nM	dAdo_nM	cot_nM			
1	4,1	32,7	2329,1	22,3	642,9	25,9	110,3	495,6	11,1	16,8	1,7	0,9	470,6	16,0	2,2	11,1	345,2	1,3	1202,4			
2	582,7	95,9	4147,3	529,8	1573,2	152,0	1020,1	658,3	18,4	85,0	9,8	18,1	501,2	1,8	9,1	2611,6	176,9	2,2	1207,3			
3	333,6	4,4	14613,7	183,0	3670,3	295,1	655,0	3951,3	18,5	62,7	13,5	17,3	13408,1	65,2	21,2	118,7	1001,8	4,4	2,0			
4	81,9	9,7	5638,5	126,9	6278,3	378,8	680,8	984,0	4,3	62,4	9,1	6,9	2618,2	6,8	4,1	214,3	1427,3	28,6	1820,2			
5	67,6	20,2	8169,4	158,6	2504,6	182,9	1738,0	4309,3	30,9	56,0	6,5	5,3	4169,2	34,4	7,6	21,9	885,1	14,4	2116,4			
6	404,0	26,5	8549,7	148,0	535,6	139,3	1505,2	1202,7	9,1	79,7	25,6	7,5	7441,7	18,8	15,4	395,1	1285,8	1,8	211,1			
7	56,4	40,0	4200,2	55,5	1118,3	121,7	2885,6	963,5	16,6	113,5	13,4	3,3	4434,5	14,9	1,6	336,8	320,3	4,3	2540,2			
8	751,3	56,4	10470,8	637,0	1411,2	94,5	6396,3	470,3	10,5	2,7	3,9	1,5	2881,7	30,9	8,2	12,8	510,3	7,9	7,6			
9	235,4	57,8	20377,4	190,4	4267,8	100,5	2699,2	4439,2	52,2	54,5	11,6	1,0	4142,6	74,3	10,8	24,1	694,8	5,6	5,4			
10	2942,7	67,4	10448,4	532,5	1586,0	72,5	3196,8	4539,5	59,7	1115,5	62,1	18,2	1034,7	29,4	18,3	1039,4	2194,1	561,7	1,5			
11	79,2	51,2	6445,6	133,2	880,7	140,1	863,6	1289,7	24,5	4,2	3,3	0,8	1926,4	28,3	4,1	22,4	384,9	4,2	1559,3			
12	100,8	16,8	6102,9	86,8	4166,8	317,3	886,5	351,2	10,3	16,7	2,2	0,3	1968,7	7,2	24,4	202,3	473,3	9,7	2032,3			
13	139,4	126,1	32052,4	493,9	3439,9	236,1	895,1	881,6	22,1	13,6	15,5	14,8	728,4	54,1	7,4	32,3	855,3	16,2	2614,2			
14	110,3	26,5	11414,4	190,0	6323,9	324,7	2063,8	1215,2	43,9	16,0	3,5	1,9	810,1	36,9	17,3	20,7	2065,3	5,1	2687,8			
15	976,4	94,5	19576,1	1620,0	3726,8	390,0	3064,1	310,8	17,1	8,7	3,2	4,3	1577,8	38,6	16,1	143,5	3330,4	21,9	2382,5			
16	186,0	21,8	10243,7	195,5	7327,5	581,1	2235,8	4295,8	5,8	26,2	16,7	12,5	2795,2	46,2	11,8	51,4	1731,4	1,1	6330,7			
17	141,2	140,7	15073,2	68,2	5133,1	548,4	9387,4	9777,5	34,1	14,0	6,1	1,0	52194,0	41,6	9,5	56,9	63283,1	67,4	2174,6			
18	4,3	107,6	3995,4	118,0	1191,4	87,7	1029,9	511,6	10,7	13,1	2,7	1,5	778,7	15,9	1,0	23,9	169,9	2,6	3,1			
19	73,9	68,7	11523,7	235,6	3648,5	117,9	2959,3	6967,3	50,4	181,7	6,8	6,3	5590,9	39,5	8,8	195,4	4361,2	155,7	7990,0			
20	486,3	134,7	9019,8	352,5	5657,1	478,5	562,9	1176,6	18,0	32,7	3,9	1,0	1206,6	8,9	3,0	100,9	199,3	15,1	2370,4			
21	57,3	103,1	6208,7	111,4	1365,0	135,4	440,2	1824,6	17,9	50,8	3,2	0,8	1825,8	12,0	9,9	77,8	173,7	6,2	2200,3			
22	45,0	68,8	7958,7	135,1	1270,7	129,0	1475,0	1328,3	34,0	20,1	3,6	6,2	3642,4	35,2	11,9	72,6	320,5	4,3	234,0			
23	33,0	48,3	6493,4	130,4	7896,1	580,8	327,0	1243,7	7,9	34,1	2,6	3,3	3219,7	9,8	2,4	111,1	127,6	6,6	2610,3			
24	632,6	95,8	9864,2	464,3	5460,8	603,6	643,6	1099,2	17,3	51,9	6,9	6,2	1205,2	11,5	3,9	89,7	221,6	7,8	1728,7			
25	259,7	115,7	12094,1	25,5	1156,9	247,0	8506,3	71027,6	476,4	142,0	4,0	2,7	17001,6	30,4	17,4	41,4	8628,3	5,1	7395,2			
26	75,7	28,8	2016,6	61,0	2687,2	292,2	616,8	675,7	0,6	22,7	2,4	6,5	434,7	21,2	4,7	34,9	259,3	2,5	10,0			
27	2656,8	49,6	18370,3	207,1	2797,3	261,4	547,4	1909,2	80,4	20,0	6,0	4,8	4931,1	26,7	14,2	27,2	1972,6	2,5	0,9			
28	2724,5	149,1	5370,0	1159,4	5701,6	242,0	6257,4	135,4	4,5	10,5	2,9	4,8	1077,1	23,0	15,4	66,3	4870,4	68,1	7,4			
29	4860,6	56,4	8509,1	192,8	2420,8	154,9	415,7	3012,9	39,6	64,5	13,2	8,2	852,8	11,0	2,2	107,0	2324,0	137,1	4,8			
30	91,2	36,3	15250,1	155,0	3877,4	303,5	674,4	2702,0	29,8	32,5	10,8	17,6	8452,9	50,7	17,9	90,7	1128,8	3,1	97,3			
31	363,5	53,1	13869,8	294,8	4661,8	177,7	26,2	995,2	13,1	17,8	52,4	8,9	100,5	54,8	9,2	3,1	7487,5	89,4	1371,9			
32	1397,0	142,7	10276,0	185,4	6167,2	500,4	12,9	1121,4	16,2	19,8	15,7	8,6	135,8	14,7	12,1	4,0	5024,3	66,3	2,9			
33	719,1	41,1	11605,0	249,6	3019,6	391,4	175,9	1457,8	36,4	6,7	2,3	7,9	62,8	57,1	4,9	5,7	3840,7	43,2	5,8			
34	1149,9	54,4	12097,7	253,7	3397,3	355,9	73,5	1721,1	51,2	8,2	34,2	13,7	75,3	24,7	4,2	1,6	4681,4	44,3	4,8			
35	1187,7	50,2	18346,1	399,0	3815,5	281,8	99,0	825,4	13,6	10,9	8,9	20,1	65,9	35,7	5,6	4,2	5421,4	53,1	107,0			
36	626,1	387,7	20356,1	611,0	5080,4	334,5	101,1	1156,7	25,1	6,6	6,0	3,2	75,2	26,2	18,5	0,7	6080,7	35,1	12861,4			
37	2464,1	9,9	5038,3	117,3	1498,1	70,8	71,4	616,3	8,2	11,2	2,0	3,1	48,2	9,5	10,5	1,2	2723,4	37,3	1,8			
38	440,9	75,6	9570,3	409,8	2602,8	168,2	103,2	1823,3	14,6	8,1	27,7	5,3	77,7	17,1	5,0	3,9	6974,8	64,6	3,1			
39	1260,2	163,4	7030,1	155,2	1087,6	96,4	74,1	567,6	5,5	7,4	1,1	2,5	51,3	50,9	2,4	9,7	1906,4	35,4	1,6			
Parametro	Gua_nM	8oxoGua_nM	7mega	1mega	Cyto	5MeCyto	5OHmcyto	Cyt	5MeCyt	dcyt	5medcyt	5OHmedcyt	guo	8guo	8dGuo	dGuo	ado	dAdo	cot			
mediana casi	124,85	57,14	8784,76	153,30	3063,54	209,52	1252,49	1208,94	17,92	33,35	5,02	3,81	2293,44	28,81	8,94	75,16	602,56	5,93	1926,25			
mediana Cor	1187,68	54,43	11605,05	249,57	3397,26	261,37	101,13	1156,70	16,23	10,86	8,86	7,94	77,67	26,18	9,18	4,20	4681,42	44,29	4,85			

### 6.1.1 Differenze di sesso

E' utile ricordare che la popolazione reclutata per questa parte dello studio è composta da 35 maschi e 4 femmine, che si distinguono in casi controllo (ID: da 27 a 39; 12 maschi e 1 femmina, 13 totali) e casi reali di overdose (ID: da 1 a 26; 23 maschi e 3 femmine, 29 totali); l'età media dei sottogruppi

è 57.3 anni per i casi controllo e 38.1 nei casi reali, mentre l'età media per i maschi è 45 anni e 39 per le femmine.

Fra i vari biomarkers indagati, gli unici parametri che sembrano venire influenzati dal progredire dell'età sono 5OHmeCyto e Guo.

Come evidenziato nella tabella 2b, sono stati presi in considerazione parametri come la mediana per confrontare i valori tra i gruppi. Non è stato possibile evidenziare delle differenze legate al sesso, data l'esiguità dei casi di soggetti femminili: non è stato possibile confermare, perciò, quanto riportato in letteratura riguardo alle concentrazioni in soggetti femminili di forme metilate della guanina e di Guo, dGuo (forme non modificate specifiche dell'RNA e del DNA) e 8-oxo-dGuo, ma anche degli indicatori di esposizione presenti in concentrazioni maggiori rispetto agli uomini.

I valori medi di creatinina (g/L) riscontrati nella popolazione indagata in questo studio sono i seguenti:

**Tabella 3.** Valori medi di creatinina in urina

	Study_group	N (soggetti)	Mean (g/L)	Std. Deviation
<b>Creatinine</b>	Controls	13	0,9	0,4
	Real Samples	26	0,5	0,5

Stratificando invece per sesso, nei maschi il valore medio è risultato essere 0,7 g/L mentre nelle femmine 0,5 g/L. Alcuni valori di creatinina sono risultati essere anche inferiori al limite di 0,3 g/L solitamente riscontrato in letteratura come cut-off di riferimento; probabilmente i valori così bassi - non essendo correlabili alla causa di morte del singolo soggetto, né alla singola sostanza rinvenuta nelle analisi tossicologiche - sono dovuti alla nefrotossicità delle droghe d'abuso che causa uno squilibrio nella clearance della creatinina, oppure potrebbe essere dovuto alle condizioni di stoccaggio del campione (ad esempio, sbalzi termici o temperatura non consona alla conservazione). Eliminando i valori di creatinina fuori dai range di normalità, i due gruppi mostrano i seguenti valori di creatinina: casi controllo 0,9 g/L, mentre casi overdose 0,7 g/L.

**Tabella 4.** Valori statistici sulla popolazione indagata

**Group Statistics**

	Study_group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
<b>Age</b>	Controls	13	57.3077	7.88865	2.18792
	Overdose samples	26	38.1538	11.39366	2.23448

Sex \* Study\_group Crosstabulation

			Study_group		Total
			Controls	Overdose samples	
Sex	Female	Count	1	3	4
		% within Study_group	7.7%	11.5%	10.3%
	Male	Count	12	23	35
		% within Study_group	92.3%	88.5%	89.7%
Total		Count	13	26	39
		% within Study_group	100.0%	100.0%	100.0%

Ad un primo sguardo d'insieme della tabella 2b, emerge come i valori di mediana riportati per i casi controllo ed i casi di overdose evidenzino delle importanti differenze nelle concentrazioni per i seguenti biomarkers: Creatinina, Guanina, 7-MetilGuanina, 5idrossi-metil-citosina, Guanosina, Deossi Guanosina, Adenosina e DeossiAdenosina. E' interessante ed importante notare come gli altri parametri siano invece praticamente identici tra i due gruppi.

L'analisi della cotinina ha evidenziato che è più probabile trovare dei soggetti fumatori tra i casi di overdose, rispetto ai casi controllo; per tale analisi è stato considerato un valore soglia di 30-100 nM per l'indicazione di fumo passivo in urina, come noto dalla letteratura. Nel dettaglio, la mediana riscontrata per la cotinina nei casi controllo è 4.85 nM, mentre risulta essere 1926.2 nM nei casi oggetto di studio (circa 400 volte più elevata).

Nella tabella 5 sono invece indicati i rapporti tra la forma nativa e la forma ossidata dei biomarker: anche in questo caso, le differenze più evidenti si riscontrano nei rapporti 8Gua/Gua, 5OHMeCyto/Cyto, 8Guo/Guo, 8dGuo/dGuo, dCyt/Cyt. L'analisi statistica eseguita su questo set di dati ha evidenziato diverse differenze significative nella comparazione dei 2 gruppi (casi controlli e casi reali di overdose) per più parametri quali Creatinina, Guanina, 5OHMeCito, con i relativi p-values per la significatività statistica, mostrati in Tabella 6; sono state inoltre analizzate le differenze significative tra i rapporti della forma ossidata con la forma nativa (Tabella 7) e rappresentate graficamente (Figura 16). Si può osservare come le basi native correlino in modo positivo con le rispettive basi modificate.

E' stata valutata anche la metilazione globale urinaria degli acidi nucleici, ossia il parametro che consiste nella misura del rapporto forma metilata / (forma metilata + sostanza tal quale).

Ad esempio, prendendo in considerazione la Cyt, la metilazione globale urinaria rispetto al rapporto semplice forma metilata/tal quale permette di conoscere la concentrazione della Cyt metilata rispetto alla Cyt totale.



Tabella 5: Rapporti di concentrazioni tra la forma nativa e la forma ossidata nei campioni di urina

ID	8oxoGua_Gua	5MeCrGua_Gro	5OHMeCrGua_Gro	5MeCr_Gr	5MeCrG_Cr	5OHMeCrG_Cr	8Gua_Gua	8Gua_dGua	dGua/dGua	dCr/dCr	dAdo/dAdo
1	7.997	0.040	0.172	0.022	0.100	0.056	0.034	0.199	0.024	0.034	0.004
2	0.165	0.097	0.648	0.028	0.116	0.213	0.004	0.003	5.211	0.129	0.012
3	0.013	0.080	0.178	0.005	0.216	0.276	0.005	0.178	0.009	0.016	0.004
4	0.118	0.060	0.108	0.004	0.145	0.110	0.003	0.019	0.082	0.063	0.020
5	0.299	0.073	0.694	0.007	0.117	0.094	0.008	0.348	0.005	0.013	0.016
6	0.065	0.260	2.810	0.008	0.321	0.095	0.003	0.039	0.053	0.066	0.001
7	0.710	0.109	2.580	0.017	0.118	0.029	0.003	0.005	0.076	0.118	0.013
8	0.075	0.067	4.532	0.022	1.426	0.545	0.011	0.639	0.004	0.006	0.015
9	0.246	0.024	0.632	0.012	0.214	0.018	0.018	0.450	0.006	0.012	0.008
10	0.023	0.046	2.016	0.013	0.056	0.016	0.028	0.018	1.005	0.246	0.256
11	0.647	0.159	0.981	0.019	0.785	0.179	0.015	0.182	0.012	0.003	0.011
12	0.166	0.076	0.213	0.029	0.131	0.020	0.004	0.121	0.103	0.048	0.021
13	0.905	0.069	0.260	0.025	1.143	1.094	0.074	0.228	0.044	0.015	0.019
14	0.240	0.051	0.326	0.036	0.219	0.117	0.046	0.837	0.026	0.013	0.002
15	0.097	0.105	0.822	0.055	0.363	0.493	0.024	0.113	0.091	0.028	0.007
16	0.117	0.079	0.305	0.001	0.636	0.478	0.017	0.230	0.018	0.006	0.001
17	0.997	0.107	1.829	0.003	0.434	0.069	0.001	0.167	0.001	0.001	0.001
18	24.754	0.074	0.865	0.021	0.205	0.117	0.020	0.043	0.031	0.026	0.015
19	0.930	0.032	0.811	0.007	0.037	0.035	0.007	0.045	0.035	0.026	0.036
20	0.277	0.085	0.100	0.015	0.118	0.030	0.007	0.030	0.084	0.028	0.076
21	1.799	0.099	0.323	0.010	0.064	0.016	0.007	0.127	0.043	0.028	0.036
22	1.528	0.102	1.161	0.026	0.181	0.308	0.010	0.164	0.020	0.015	0.013
23	1.466	0.074	0.041	0.006	0.078	0.096	0.003	0.022	0.035	0.027	0.052
24	0.151	0.111	0.118	0.016	0.132	0.120	0.010	0.043	0.074	0.047	0.035
25	0.446	0.214	7.352	0.007	0.028	0.019	0.002	0.420	0.002	0.002	0.001
26	0.381	0.109	0.230	0.001	0.105	0.286	0.049	0.136	0.080	0.034	0.009
27	0.019	0.093	0.196	0.042	0.300	0.242	0.005	0.521	0.006	0.010	0.001
28	0.055	0.042	1.097	0.033	0.274	0.459	0.021	0.232	0.062	0.078	0.014
29	0.012	0.064	0.172	0.013	0.205	0.128	0.013	0.021	0.125	0.021	0.059
30	0.398	0.078	0.174	0.011	0.333	0.543	0.006	0.198	0.011	0.012	0.003
31	0.146	0.038	0.006	0.013	2.948	0.499	0.545	2.936	0.031	0.018	0.012
32	0.102	0.081	0.002	0.014	0.791	0.436	0.108	2.992	0.030	0.018	0.013
33	0.057	0.130	0.058	0.025	1.186	1.186	0.099	0.850	0.091	0.005	0.011
34	0.047	0.105	0.022	0.030	4.181	1.678	0.328	2.684	0.021	0.005	0.009
35	0.042	0.074	0.026	0.017	0.815	1.855	0.541	1.330	0.064	0.013	0.010
36	0.619	0.066	0.020	0.022	0.910	0.482	0.348	26.640	0.009	0.006	0.006
37	0.004	0.047	0.048	0.013	0.177	0.277	0.138	8.944	0.024	0.018	0.014
38	0.172	0.065	0.040	0.008	3.406	0.648	0.220	1.279	0.050	0.004	0.009
39	0.130	0.089	0.068	0.010	0.151	0.331	0.992	0.251	0.189	0.013	0.019
Parametro	8Gua_Gua	5MeCrGua_Gro	5OHMeCrGua_Gro	5MeCr_Gr	5MeCrG_Cr	5OHMeCrG_Cr	8Gua_Gua	8Gua_dGua	dGua/dGua	dCr/dCr	dAdo/dAdo
mediana casi reali	0.29	0.08	0.64	0.01	0.14	0.10	0.01	0.13	0.03	0.03	0.01
mediana Controlli	0.06	0.07	0.05	0.01	0.35	0.48	0.22	1.28	0.03	0.01	0.01

**Tabella 6.** Caratteristiche demografiche e biochimiche della popolazione studiata

<i>Parametro</i>	<i>Casi Controllo (n=13)</i>	<i>Casi indagati (n=26)</i>	<i>p-value</i>
Age, mean (SD)	57.3 (7.9)	38.2 (11.4)	<b>&lt;0.001</b>
Male, n (%)	12 (92.3)	23 (88.5)	0.709
Cr	8.8 (5.1-12.5)	2.7 (1.5-5.3)	<b>0.001</b>
Gua	1187.7 (533.5-2560.5)	124.8 (65.0-424.6)	<b>&lt;0.001</b>
8oxoGua	54.4 (45.4-145.9)	57.1 (26.5-97.7)	0.353
7megua	11605 (7769.6-16798.1)	8784.8 (5986.8-11666.3)	0.159
1megua	249.6 (170.3-404.4)	153.3 (105.3-380.5)	0.076
Cyto	3397.3 (2511.8-4871.1)	3063.6 (1250.9-5215.0)	0.546
5MeCyto	261.4 (161.5-345.2)	209.5 (120.8-381.60)	0.691
5ohmecyto	101.1 (72.5-461.6)	1252.5 (652.2-2904.0)	<b>&lt;0.001</b>
Cyt	1156.7 (720.9-1866.3)	1208.9 (671.4-4299.2)	0.67
5MeCyt	16.2 (10.7-38)	17.9 (10.5-34.0)	0.988
dcyt	10.9 (7.8-19.9)	33.4 (15.5-66.9)	<b>0.006</b>
5medcyt	8.9 (2.6-21.7)	5.1 (3.2-12.1)	0.586
5ohmedcyt	7.9 (4.0-11.3)	3.8 (1.0-7.1)	0.066
guo	77.7 (64.4-964.9)	2293.5 (978.6-4235.5)	<b>0.001</b>
8guo	26.2 (15.9-50.8)	28.9 (11.9-38.8)	0.627
8dGuo	9.2 (4.6-14.8)	8.9 (4.1-15.6)	0.848
Ado	4681.4 (2148.3-5751.1)	602.6 (249.9-1814.9)	<b>&lt;0.001</b>
dAdo	44.3 (35.3-67.2)	5.9 (3.8-15.4)	<b>0.003</b>
dGuo	4.2 (2.4-46.8)	75.2 (24.1-197-1)	<b>&lt;0.001</b>
cot	4.8 (2.4-102.2)	1926.3 (160.8-2557.7)	<b>0.002</b>

**Legenda:** tutti i valori degli analiti sono riportati come mediana (interquartile range). Tutti i confronti sono stati effettuati utilizzando U-test Mann-Whitney non parametrico. Valori di P inferiori a 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi e segnalati in grassetto. L'età (age) è stata comparata utilizzando il t-test di Student e le differenze di sesso tramite il test del  $\chi^2$

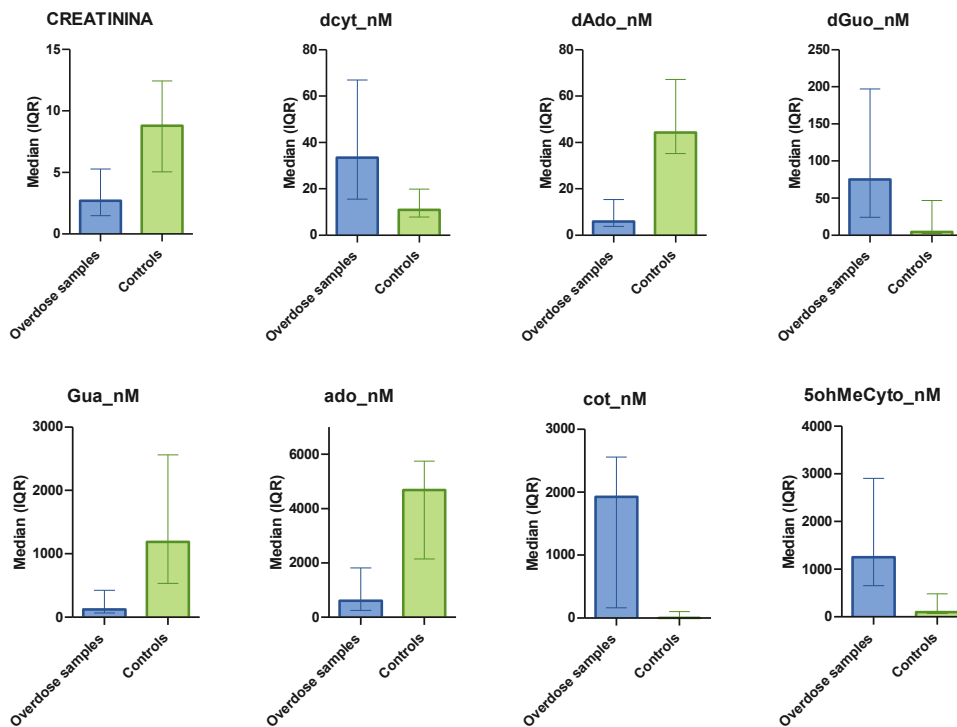
**Tabella 7.** Differenze nel rapporto tra analiti

<i>Analiti</i>	<i>Casi Controllo (n=13)</i>	<i>Casi indagati (n=26)</i>	<i>p-value</i>
8oxoGua_Gua	0.057 (0.03-0.16)	0.29 (0.12-0.95)	<b>0.002</b>
5MeCyto_Cyto	0.074 (0.56-0.91)	0.079 (0.07-0.11)	0.338
5OHMeCyto_Cyto	0.048 (0.02-0.17)	0.64 (0.2-1.3)	<b>&lt;0.001</b>
5MeCyt_Cyt	0.014 (0.01-0.03)	0.014 (0.01-0.02)	0.255
5MedCyt_dCyt	0.343 (0.24-1.93)	0.139 (0.1-0.33)	<b>0.002</b>
5OHMedCyt_dCyt	0.485 (0.31-0.92)	0.104 (0.03-0.28)	<b>&lt;0.001</b>
8Guo_Guo	0.22 (0.02-0.54)	0.009 (0.003-0.02)	<b>&lt;0.001</b>
8dGuo_dGuo	1.282 (0.24-2.9)	0.131 (0.04-0.23)	<b>&lt;0.001</b>
dGuo/Guo	0.031 (0.02-0.08)	0.035 (0.01-0.08)	0.803
dCyt/Cyt	0.013 (0.01-0.02)	0.027 (0.01-0.05)	0.054
dAdo/Ado	0.011 (0.01-0.1)	0.013 (0.004-0.2)	0.508

**Legenda:** tutti i valori degli analiti sono riportati come mediana (interquartile range). Tutti i confronti sono stati effettuati utilizzando U-test Mann-Whitney non parametrico.

Applicando la correzione con il test di Bonferroni, tutti i valori inferiori a 0.00238 in Tabella 4 rimangono statisticamente significativi, allo stesso modo tutti i valori inferiori a 0.00455 in Tabella 5 rimangono statisticamente significativi.

Figura 16. Confronti tra mediane dei biomarkers (gruppo di controllo “controls” vs. gruppo casi reali):



Le correlazioni di tutti gli analiti oggetto di studio sono state eseguite anche singolarmente all'interno dei gruppi:

Control	Spearman correlation	Cr	Cr	Gua	8 oxoGua	7 meGua	1 meGua	Cyto	5 MeCyt	5 ohMeCyt	Cyt	5 MeCyt	dcyt	5 medCyt	5 ohMedCyt	guo	8 guo	8 dGuo	ado	dAdo	dGuo	cot
Cr	Correlation Coefficient	1	<b>999**</b>	<b>-780**</b>	-0,165	<b>-736**</b>	0,209	0,368	0,451	-0,077	0,396	0,286	0	0,539	<b>-649*</b>	0,132	0,28	0,28	0,368	-0,17	-0,269	<b>589*</b>
	Sig. (2-tailed)		<0,001	0,002	0,59	0,004	0,494	0,216	0,122	0,803	0,181	0,344	1	0,057	0,016	0,668	0,354	0,354	0,216	0,578	0,374	0,034
Cr	Correlation Coefficient	<b>999**</b>	1	<b>-787**</b>	-0,135	<b>-743**</b>	0,215	0,366	0,454	-0,072	0,393	0,283	-0,014	0,537	<b>-647*</b>	0,135	0,308	0,264	0,36	-0,173	-0,25	<b>587*</b>
	Sig. (2-tailed)	<0,001		0,001	0,661	0,004	0,481	0,219	0,119	0,816	0,184	0,348	0,964	0,058	0,017	0,661	0,306	0,383	0,226	0,571	0,409	0,035
Gua	Correlation Coefficient	<b>-780**</b>	<b>-787**</b>	1	0,132	-0,473	0,132	-0,143	-0,225	-0,291	0,154	-0,181	-0,033	-0,297	-0,366	0,071	-0,549	-0,176	-0,33	0,22	0,363	-0,52
	Sig. (2-tailed)	0,002	0,001		0,668	0,103	0,642	0,459	0,334	0,616	0,553	0,915	0,325	0,204	0,219	0,817	0,052	0,566	0,271	0,471	0,223	0,069
8 oxoGua	Correlation Coefficient	-0,165	-0,135	0,132	1	-0,099	0,478	0,258	0,016	-0,071	-0,269	-0,275	-0,418	0,041	-0,338	0	-0,143	-0,016	0,341	0,264	-0,088	0,085
	Sig. (2-tailed)	0,59	0,661	0,668		0,748	0,098	0,394	0,957	0,817	0,374	0,364	0,156	0,894	0,258	1	0,642	0,957	0,255	0,384	0,775	0,782
7 meGua	Correlation Coefficient	<b>736**</b>	<b>743**</b>	-0,473	-0,099	1	0,275	0,39	<b>-555*</b>	0,082	0,396	0,533	0,005	0,305	0,418	0,247	0,473	0,396	0,187	-0,418	-0,148	0,457
	Sig. (2-tailed)	0,004	0,004	0,103	0,748		0,364	0,188	0,049	0,789	0,181	0,061	0,986	0,31	0,155	0,415	0,103	0,181	0,541	0,156	0,629	0,117
1 meGua	Correlation Coefficient	0,209	0,215	-0,143	0,478	0,275	1	0,456	0,198	0,214	-0,159	-0,121	-0,473	0,248	0,069	0,082	0,093	0,17	<b>731**</b>	0,324	-0,214	<b>-553*</b>
	Sig. (2-tailed)	0,494	0,481	0,642	0,098	0,364		0,117	0,517	0,482	0,603	0,694	0,103	0,415	0,823	0,789	0,762	0,578	0,005	0,28	0,482	0,05
Cyto	Correlation Coefficient	0,368	0,366	-0,225	0,258	0,39	0,456	1	<b>-670*</b>	-0,027	-0,148	-0,06	0,033	0,358	0,404	0,429	0,088	<b>-643*</b>	0,484	0,214	-0,115	<b>-605*</b>
	Sig. (2-tailed)	0,216	0,219	0,459	0,394	0,188	0,117		0,012	0,929	0,629	0,845	0,915	0,23	0,171	0,144	0,775	0,018	0,094	0,482	0,707	0,028
5 MeCyt	Correlation Coefficient	0,451	0,454	-0,291	0,016	<b>-555*</b>	0,198	<b>-670*</b>	1	-0,033	0,22	0,484	-0,148	0,256	0,481	0,187	0,258	0,291	0,17	-0,137	-0,115	0,319
	Sig. (2-tailed)	0,122	0,119	0,334	0,957	0,049	0,517	0,012		0,915	0,471	0,094	0,629	0,399	0,096	0,541	0,394	0,334	0,578	0,655	0,707	0,288
5 ohMeCyt	Correlation Coefficient	-0,077	-0,072	0,154	-0,071	0,082	0,214	-0,027	-0,033	1	0,368	0,236	0,121	-0,264	-0,061	0,538	0,093	0,231	-0,401	-0,203	<b>-703**</b>	0,099
	Sig. (2-tailed)	0,803	0,816	0,616	0,817	0,789	0,482	0,929	0,915		0,216	0,437	0,694	0,383	0,844	0,058	0,762	0,448	0,174	0,505	0,007	0,748
Cyt	Correlation Coefficient	0,396	0,393	-0,181	-0,269	0,396	-0,159	-0,148	0,22	0,368	1	<b>-863**</b>	0,407	0,451	0,358	0,505	-0,066	-0,099	-0,253	-0,137	0,291	-0,044
	Sig. (2-tailed)	0,181	0,184	0,553	0,374	0,181	0,603	0,629	0,471	0,216		0	0,168	0,122	0,23	0,078	0,831	0,748	0,405	0,655	0,334	0,886
5 MeCyt	Correlation Coefficient	0,286	0,283	-0,033	-0,275	0,533	-0,121	-0,06	0,484	0,236	<b>-863**</b>	1	0,253	0,322	0,33	0,346	0,027	-0,099	-0,269	-0,269	0,143	-0,096
	Sig. (2-tailed)	0,344	0,348	0,915	0,364	0,061	0,694	0,845	0,094	0,437	<0,001		0,405	0,284	0,271	0,247	0,929	0,748	0,374	0,374	0,642	0,754
dcyt	Correlation Coefficient	0	-0,014	0,297	-0,418	0,005	-0,473	0,033	-0,148	0,121	0,407	0,253	1	0,336	0,404	<b>-659*</b>	-0,286	0,093	-0,346	0,192	0,505	-0,171
	Sig. (2-tailed)	1	0,964	0,325	0,156	0,986	0,103	0,915	0,629	0,694	0,168	0,405		0,262	0,171	0,014	0,344	0,762	0,247	0,529	0,078	0,577
5 medCyt	Correlation Coefficient	0,539	0,537	-0,377	0,041	0,305	0,248	0,358	0,256	-0,264	0,451	0,322	0,336	1	<b>-690**</b>	0,432	-0,107	-0,096	0,501	0,49	-0,168	0,289
	Sig. (2-tailed)	0,057	0,058	0,204	0,894	0,31	0,415	0,23	0,399	0,383	0,122	0,284	0,262		0,009	0,141	0,727	0,754	0,081	0,089	0,584	0,338
5 ohMedCyt	Correlation Coefficient	<b>-649*</b>	<b>-647*</b>	-0,366	-0,338	0,418	0,069	0,404	0,481	-0,061	0,358	0,33	0,404	<b>-690**</b>	1	0,349	0,201	-0,074	0,184	0,303	0,14	0,46
	Sig. (2-tailed)	0,016	0,017	0,219	0,258	0,155	0,823	0,171	0,096	0,844	0,23	0,271	0,171	0,009		0,242	0,511	0,809	0,547	0,315	0,648	0,114
guo	Correlation Coefficient	0,132	0,135	0,071	0	0,247	0,082	0,429	0,187	0,538	0,505	0,346	<b>-659*</b>	0,432	0,349	1	-0,088	0,401	-0,148	0,115	<b>-582*</b>	0,083
	Sig. (2-tailed)	0,668	0,661	0,817	1	0,415	0,789	0,144	0,541	0,058	0,078	0,247	0,014	0,141	0,242		0,775	0,174	0,629	0,707	0,037	0,789
8 guo	Correlation Coefficient	0,28	0,308	-0,549	-0,143	0,473	0,093	0,088	0,258	0,093	-0,066	0,027	-0,286	-0,107	0,201	-0,088	1	-0,022	-0,055	-0,308	0,126	0,347
	Sig. (2-tailed)	0,354	0,306	0,052	0,642	0,103	0,762	0,775	0,394	0,762	0,831	0,929	0,344	0,727	0,511	0,775		0,943	0,859	0,681	0,246	0,246
8 dGuo	Correlation Coefficient	0,28	0,264	-0,176	-0,016	0,396	0,17	<b>-643*</b>	0,291	0,231	-0,099	-0,099	0,093	-0,096	-0,074	0,401	-0,022	1	0,115	-0,385	-0,121	0,319
	Sig. (2-tailed)	0,354	0,383	0,566	0,957	0,181	0,578	0,018	0,334	0,448	0,748	0,748	0,762	0,754	0,809	0,174	0,943		0,707	0,194	0,694	0,288
ado	Correlation Coefficient	0,368	0,36	-0,33	0,341	0,187	<b>-731**</b>	0,484	0,17	-0,401	-0,253	-0,269	-0,346	0,501	0,184	-0,148	-0,055	0,115	1	0,511	<b>-610*</b>	0,503
	Sig. (2-tailed)	0,216	0,226	0,271	0,255	0,541	0,005	0,094	0,578	0,174	0,405	0,374	0,247	0,081	0,547	0,629	0,859	0,707		0,074	0,027	0,079
dAdo	Correlation Coefficient	-0,17	-0,173	0,22	0,264	-0,418	0,324	0,214	-0,137	-0,203	-0,137	-0,269	0,192	0,49	0,303	0,115	-0,308	-0,385	0,511	1	0,077	0,22
	Sig. (2-tailed)	0,578	0,571	0,471	0,384	0,156	0,28	0,482	0,655	0,505	0,655	0,374	0,529	0,089	0,315	0,707	0,306	0,194	0,074		0,803	0,47
dGuo	Correlation Coefficient	-0,269	-0,25	0,363	-0,088	-0,148	-0,214	-0,115	-0,115	<b>-703**</b>	0,291	0,143	0,505	-0,168	0,14	<b>-582*</b>	0,126	-0,121	<b>-610*</b>	0,077	1	-0,16
	Sig. (2-tailed)	0,374	0,409	0,223	0,775	0,629	0,482	0,707	0,707	0,007	0,334	0,642	0,078	0,584	0,648	0,037	0,681	0,694	0,027	0,803		0,603
cot	Correlation Coefficient	<b>-589*</b>	<b>-587*</b>	-0,52	0,085	0,457	<b>-555*</b>	<b>-605*</b>	0,319	0,099	-0,044	-0,096	-0,171	0,289	0,46	0,083	0,347	0,319	0,503	0,22	-0,16	1
	Sig. (2-tailed)	0,034	0,035	0,069	0,782	0,117	0,05	0,028	0,288	0,748	0,886	0,754	0,577	0,338	0,114	0,789	0,246	0,288	0,079	0,47	0,603	

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).  
\* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Tabella 8. Correlazione statistica tra i parametri nel gruppo di controllo

Real samples	Spearman correlation	Cr	Cr	Gua	8 oxoGua	7 meGua	1 meGua	Cyto	5 MeCyto	5 ohMeCyto	Cyt	5 MeCyt	deyt	5 medCyt	5 ohMedCyt	guo	8 guo	8 dGuo	ado	dAdo	dGuo	cot
Cr	Correlation Coefficient	1	.893**	0.306	-0.074	.764**	0.342	0.331	0.113	.421*	.569**	.481*	0.22	.407*	0.215	.429*	.707**	.713**	.631**	0.304	0.072	0.209
	Sig. (2-tailed)		<0.001	0.128	0.719	<0.001	0.087	0.098	0.584	0.032	0.002	0.013	0.28	0.039	0.291	0.029	<0.001	<0.001	0.001	0.131	0.728	0.305
Cr	Correlation Coefficient	.893**	1	0.267	-0.082	.650**	0.321	0.294	0.231	0.354	.491*	0.375	0.168	0.334	0.312	0.37	.579**	.703**	.651**	0.346	0.151	0.326
	Sig. (2-tailed)	<0.001		0.188	0.69	<0.001	0.11	0.146	0.257	0.076	0.011	0.059	0.413	0.095	0.12	0.063	0.002	<0.001	<0.001	0.084	0.463	0.104
Gua	Correlation Coefficient	0.306	0.267	1	0.166	.549**	.692**	0.21	0.242	0.383	0.015	0.182	0.123	.493*	0.34	0.021	0.151	.477*	0.381	0.277	0.303	-0.148
	Sig. (2-tailed)	0.128	0.188		0.417	0.004	0	0.304	0.234	0.053	0.943	0.373	0.55	0.011	0.09	0.919	0.46	0.014	0.055	0.17	0.132	0.47
8 oxoGua	Correlation Coefficient	-0.074	-0.082	0.166	1	0.259	0.168	-0.116	-0.054	0.182	0.099	.412*	-0.137	-0.052	-0.172	-0.133	0.007	-0.179	-0.122	0.256	0.042	0.17
	Sig. (2-tailed)	0.719	0.69	0.417		0.202	0.413	0.572	0.793	0.373	0.63	0.037	0.504	0.801	0.402	0.516	0.972	0.382	0.554	0.206	0.837	0.407
7 meGua	Correlation Coefficient	.764**	.650**	.549**	.692**	1	.514**	0.34	0.204	.551**	.441*	.566**	0.037	0.022	.433*	0.147	.406**	.760**	.496**	.658**	.487*	0.246
	Sig. (2-tailed)	<0.001	<0.001	0.004	0.202		0.007	0.089	0.317	0.004	0.024	0.003	0.917	0.026	0.473	0.04	<0.001	0.01	<0.001	0.012	0.696	0.226
1 meGua	Correlation Coefficient	0.342	0.321	.692**	0.168	.514**	1	0.305	0.074	0.244	-0.071	0.193	-0.03	.433*	.441*	-0.186	0.258	0.214	0.154	0.346	0.16	-0.056
	Sig. (2-tailed)	0.087	0.11	<0.001	0.413	0.007		0.129	0.719	0.23	0.729	0.344	0.883	0.026	0.024	0.364	0.203	0.295	0.454	0.083	0.434	0.784
Cyto	Correlation Coefficient	0.331	0.294	0.21	-0.116	0.34	0.305	1	.743**	-0.082	0.117	-0.101	-0.068	0.052	0.102	-0.01	0.097	0.092	0.143	.418*	0.094	0.338
	Sig. (2-tailed)	0.098	0.146	0.304	0.572	0.089	0.129		0	0.692	0.571	0.624	0.741	0.8	0.621	0.962	0.636	0.655	0.487	0.034	0.648	0.091
5 MeCyto	Correlation Coefficient	0.113	0.231	0.242	-0.054	0.204	0.074	.743**	1	-0.179	0.034	-0.246	-0.122	-0.018	0.096	0.076	-0.073	0.081	0.104	0.168	0.158	.466*
	Sig. (2-tailed)	0.584	0.257	0.234	0.793	0.317	0.719	<0.001		0.38	0.87	0.225	0.553	0.93	0.643	0.711	0.724	0.695	0.615	0.411	0.442	0.016
5 ohMeCyto	Correlation Coefficient	.421*	0.354	0.383	0.182	.551**	0.244	-0.082	-0.179	1	0.337	.464*	0.094	.391*	0.12	.465*	.519**	.423*	.702**	0.284	0.03	0.136
	Sig. (2-tailed)	0.032	0.076	0.053	0.373	0.004	0.23	0.692	0.38		0.093	0.017	0.648	0.049	0.56	0.017	0.007	0.031	<0.001	0.159	0.885	0.506
Cyt	Correlation Coefficient	.569**	.491*	0.015	0.099	.441*	-0.071	0.117	0.034	0.337	1	.642**	.489*	.409*	0.116	.609**	.453*	.321	.447*	0.194	0.004	0.188
	Sig. (2-tailed)	0.002	0.011	0.943	0.63	0.024	0.729	0.571	0.87	0.093		0	0.011	0.038	0.572	0.001	0.02	0.11	0.022	0.343	0.983	0.359
5 MeCyt	Correlation Coefficient	.481*	0.375	0.182	.412*	.566**	0.193	-0.101	-0.246	.464*	.642**	1	0.244	0.254	-0.031	0.253	.478*	.369	.416*	0.336	-0.117	0.099
	Sig. (2-tailed)	0.013	0.059	0.373	0.037	0.003	0.344	0.624	0.225	0.017	0		0.229	0.211	0.88	0.213	0.013	0.064	0.035	0.093	0.568	0.037
deyt	Correlation Coefficient	0.22	0.168	0.123	-0.137	-0.022	-0.03	-0.068	-0.122	0.094	.489*	0.244	1	.559**	.485*	0.344	-0.149	0.172	0.146	0.058	.605**	0.037
	Sig. (2-tailed)	0.28	0.413	0.55	0.504	0.917	0.883	0.741	0.553	0.648	0.011	0.229		0.003	0.012	0.085	0.466	0.402	0.477	0.777	0.001	0.857
5 medCyt	Correlation Coefficient	.407*	0.334	.493*	-0.052	.435*	.435*	0.052	-0.018	.391*	.409*	0.254	.559**	1	.678**	0.331	0.322	0.24	.394*	0.108	.402*	-0.045
	Sig. (2-tailed)	0.039	0.095	0.011	0.801	0.026	0.026	0.8	0.93	0.049	0.038	0.211	0.003		<0.001	0.099	0.108	0.237	0.047	0.6	0.042	0.827
5 ohMedCyt	Correlation Coefficient	0.215	0.312	0.34	-0.172	0.147	.441*	0.102	0.096	0.12	0.116	-0.031	.485*	.678**	1	-0.031	0.172	0.195	0.233	-0.001	.461*	-0.094
	Sig. (2-tailed)	0.291	0.12	0.09	0.402	0.473	0.024	0.621	0.643	0.56	0.572	0.88	0.012	<0.001		0.88	0.4	0.339	0.251	0.997	0.018	0.649
guo	Correlation Coefficient	.429*	0.37	0.021	-0.133	.406*	-0.186	-0.01	0.076	.465*	.600**	0.253	0.344	0.331	-0.031	1	0.347	0.303	.446*	0.165	0.175	0.173
	Sig. (2-tailed)	0.029	0.063	0.919	0.516	0.04	0.364	0.962	0.711	0.017	0.001	0.213	0.085	0.099	0.88		0.082	0.132	0.022	0.422	0.391	0.397
8 guo	Correlation Coefficient	.707**	.579**	0.151	0.007	.760**	0.258	0.097	-0.073	.519**	.453*	.478*	-0.149	0.322	0.172	0.347	1	.411*	.614**	0.104	-0.377	0.064
	Sig. (2-tailed)	<0.001	0.002	0.46	0.972	<0.001	0.203	0.636	0.724	0.007	0.02	0.013	0.466	0.108	0.4	0.082		0.037	0.001	0.614	0.058	0.756
8 dGuo	Correlation Coefficient	.713**	.703**	.477*	-0.179	.496**	0.214	0.092	0.081	.423*	.321	0.369	0.172	0.24	0.195	0.303	.411*	1	.591**	0.128	0.239	-0.03
	Sig. (2-tailed)	<0.001	<0.001	0.014	0.382	0.01	0.295	0.655	0.695	0.031	0.11	0.064	0.402	0.237	0.339	0.132	0.037		0.001	0.535	0.24	0.885
ado	Correlation Coefficient	.631**	.651**	0.381	-0.122	.658**	0.154	0.143	0.104	.702**	.447*	.416*	0.146	.394*	0.233	.446*	.614**	.591**	1	.389*	0.043	0.259
	Sig. (2-tailed)	0.001	<0.001	0.055	0.554	<0.001	0.454	0.487	0.615	<0.001	0.022	0.035	0.477	0.047	0.251	0.022	0.001	0.001		0.049	0.833	0.201
dAdo	Correlation Coefficient	0.304	0.346	0.277	0.256	.487*	0.346	.418*	0.168	0.284	0.194	0.336	0.058	0.108	-0.001	0.165	0.104	0.128	.389**	1	0.22	0.217
	Sig. (2-tailed)	0.131	0.084	0.17	0.206	0.012	0.083	0.034	0.411	0.159	0.343	0.093	0.777	0.6	0.997	0.422	0.614	0.535	0.049		0.28	0.217
dGuo	Correlation Coefficient	0.072	0.151	0.303	-0.042	-0.08	0.16	0.094	0.158	0.03	0.004	-0.117	.605**	.402*	.461*	0.175	-0.377	0.239	0.043	0.22	1	0.016
	Sig. (2-tailed)	0.728	0.463	0.132	0.837	0.696	0.434	0.648	0.442	0.885	0.983	0.568	0.001	0.042	0.018	0.391	0.058	0.24	0.833	0.28		0.938
cot	Correlation Coefficient	0.209	0.326	-0.148	0.17	0.246	-0.056	0.338	.466*	0.136	0.188	0.099	0.037	-0.045	-0.094	0.173	0.064	-0.03	0.259	0.217	0.016	1
	Sig. (2-tailed)	0.305	0.104	0.47	0.407	0.226	0.784	0.091	0.016	0.506	0.359	0.631	0.857	0.827	0.649	0.397	0.756	0.885	0.201	0.287	0.938	

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).  
 \* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**Tabella 9.** Correlazione statistica tra i parametri nel gruppo dei casi di overdose

Nell'abuso di sostanze cronico e acuto, in cui diventa necessario definire dei biomarcatori specifici, la metilazione del DNA agisce come una potenziale firma per gli stimoli ambientali. Per vari tipi di abuso di sostanze e alcol, le firme di metilazione mostrano specificità e stabilità in relazione al tipo e al momento dell'esposizione.

Per quanto riguarda le correlazioni, è stato monitorato in primo luogo l'andamento delle sostanze non modificate come Cr, Guo, dGuo, Cyto, Cyt, e dCyt, andando a stratificare i dati e considerando inizialmente solo gli indicatori di danno ossidativo e di metilazione agli acidi nucleici.

Nello specifico, applicando anche il Mann-Whitney U test ai dati, è emerso quanto segue:

- analiti quali 8-oxo-Gua, 7-MeGua, Cyto, 5MeCyto, Cyt, 5MeCyt, 5medcyt, 8guo, 8dGuo, e rapporti tra 5MeCyto/Cyto, dGuo/Guo, dAdo/Ado non sembrerebbero essere biomarkers predittivi adatti per le droghe d'abuso in generale e per le poliassunzioni;
- al contrario, analiti come Cr, 5OHmecyto, Guo, dGuo, e rapporti come 8oxoGua/Gua, 5OHMeCyto/Cyto, 8Guo/Guo, 8dGuo/dGuo potrebbero dare un'indicazione sullo stress ossidativo provocato dall'abuso di una o più sostanze: in particolare, i valori di Gua e 5OHmedcyt sembrano essere in correlazione positiva con tutte le sostanze, eccetto che con le benzodiazepine; 1-MeGua sembrerebbe correlare positivamente con i soggetti che abusano solo di morfina, mentre deyt e 5medcyt correlano positivamente con soggetti che fanno abuso di cocaina, morfina e THC;
- i valori di Ado risulterebbero correlare positivamente ed essere predittivi di un abuso per le droghe in esame, tranne che per THC;
- valori di dAdo e il rapporto tra deyt/cyt correlano positivamente per abuso di cocaina e metadone.

Mann-Whitney U Test Report

	All Drug Users		Benzo Users		Coca Users		Metadone Users		Morfina Users		Thc Users	
	p-value	Result	p-value	Result	p-value	Result	p-value	Result	p-value	Result	p-value	Result
Age	<.001	Significant	.005	Significant	<.001	Significant	<.001	Significant	<.001	Significant	<.001	Significant
Cr_mM	<.001	Significant	.002	Significant	.034	Significant	.003	Significant	.088	Not Significant	.003	Significant
Gua_nM	<.001	Significant	.067	Not Significant	.006	Significant	.017	Significant	.002	Significant	.002	Significant
8oxoGua_nM	.353	Not Significant	1.000	Not Significant	.057	Not Significant	.744	Not Significant	.131	Not Significant	1.000	Not Significant
7megua_nM	.159	Not Significant	.438	Not Significant	.336	Not Significant	.695	Not Significant	.410	Not Significant	.877	Not Significant
1megua_nM	.076	Not Significant	.938	Not Significant	.336	Not Significant	.292	Not Significant	.036	Significant	.056	Not Significant
Cyto_nM	.546	Not Significant	.438	Not Significant	.840	Not Significant	1.000	Not Significant	.784	Not Significant	1.000	Not Significant
5MeCyt_nM	.691	Not Significant	.438	Not Significant	.724	Not Significant	.896	Not Significant	.522	Not Significant	.757	Not Significant
5Ohmecyto_nM	<.001	Significant	.011	Significant	<.001	Significant	.001	Significant	<.001	Significant	.001	Significant
Cyt_nM	.670	Not Significant	.588	Not Significant	.840	Not Significant	.512	Not Significant	.115	Not Significant	.097	Not Significant
5MeCyt_nM	1.000	Not Significant	.877	Not Significant	.479	Not Significant	.794	Not Significant	.563	Not Significant	.393	Not Significant
dCyt_nM	.006	Significant	.157	Not Significant	.034	Significant	.051	Not Significant	.012	Significant	.024	Significant
5MedCyt_nM	.586	Not Significant	.699	Not Significant	.920	Not Significant	.744	Not Significant	.832	Not Significant	.643	Not Significant
5OhmedCyt_nM	.071	Not Significant	.588	Not Significant	.362	Not Significant	.471	Not Significant	.166	Not Significant	.019	Significant
guo_nM	<.001	Significant	.037	Significant	.006	Significant	.009	Significant	.008	Significant	.003	Significant
8Guo_nM	.627	Not Significant	.757	Not Significant	.840	Not Significant	.357	Not Significant	.446	Not Significant	.817	Not Significant
8dGuo_nM	.872	Not Significant	.485	Not Significant	.311	Not Significant	.647	Not Significant	1.000	Not Significant	.643	Not Significant
ado_nM	<.001	Significant	<.001	Significant	<.001	Significant	.001	Significant	.004	Significant	.311	Not Significant
dAdo_nM	.003	Significant	.081	Not Significant	.002	Significant	.025	Significant	.057	Not Significant	.067	Not Significant
dGuo_nM	<.001	Significant	.014	Significant	<.001	Significant	<.001	Significant	.015	Significant	.019	Significant
cot_nM	.002	Significant	.081	Not Significant	.057	Not Significant	.002	Significant	.186	Not Significant	.006	Significant
8oxoGua_Gua	.002	Significant	.037	Significant	.243	Not Significant	.030	Significant	.042	Significant	.019	Significant
5MeCyt_Cyto	.308	Not Significant	.938	Not Significant	.960	Not Significant	.292	Not Significant	.693	Not Significant	.393	Not Significant
5OHMeCyt_Cyto	<.001	Significant	.014	Significant	<.001	Significant	.007	Significant	<.001	Significant	.002	Significant
5MeCyt_Cyt	.231	Not Significant	.877	Not Significant	.479	Not Significant	.845	Not Significant	.186	Not Significant	.024	Significant
5MedCyt_dCyt	.002	Significant	.067	Not Significant	.016	Significant	.082	Not Significant	.012	Significant	.024	Significant
5OHMedCyt_dCyt	<.001	Significant	.067	Not Significant	.003	Significant	.036	Significant	<.001	Significant	.001	Significant
8Guo_Guo	<.001	Significant	.030	Significant	.003	Significant	.003	Significant	.008	Significant	.005	Significant
8dGuo_dGuo	<.001	Significant	.006	Significant	<.001	Significant	.001	Significant	.004	Significant	.014	Significant
dGuo/Guo	.803	Not Significant	.938	Not Significant	.801	Not Significant	.357	Not Significant	.208	Not Significant	.183	Not Significant
dCyt/Cyt	.054	Not Significant	.067	Not Significant	.034	Significant	.009	Significant	.343	Not Significant	.817	Not Significant
dAdo/Ado	.527	Not Significant	.056	Not Significant	.511	Not Significant	.110	Not Significant	.446	Not Significant	.817	Not Significant

Tabella 10. Correlazioni tra droghe d'abuso e biomarkers tramite Mann-Whitney U test

Le concentrazioni di cotinina sono, come atteso, maggiori nei fumatori (senza distinzione di genere) ed, inoltre, esse risultano essere correlate all'uso di THC. La letteratura scientifica fornisce risultati contrastanti riguardanti l'influenza del fumo attivo e passivo sugli indicatori di stress ossidativo. Le differenze possono essere in parte legate agli indicatori stessi e alla tecnica analitica utilizzata, ma anche alle abitudini quotidiane ed individuali rispetto al fumo, difficilmente standardizzabili.

L'aumento dei livelli di 7-MeGua era già stato osservato nello studio di Tamae<sup>153</sup> e non sembra essere correlato al fumo o alla cotinina in questa popolazione.

È stato inoltre notato che secondo il test Mann-Whitney eseguito su questi dati:

- il rapporto 8-oxo-Gua/Gua correla positivamente con tutte le droghe tranne che con la cocaina;
- i rapporti 8Guo/Guo e 8-dGuo/dGuo correlano positivamente con tutte le droghe d'abuso, ad indicazione del danno che potrebbero apportare.

<sup>153</sup> Tamae, K., Kawai, K., Yamasaki, S., Kawanami, K., Ikeda, M., Takahashi, K. Kasai, H. (2009). Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanin and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Science*, 100(4), 715–721. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01088.x>

Le correlazioni sono state eseguite sulla base dei confronti tra i valori ottenuti dalle mediane degli analiti fra il gruppo di controllo e il gruppo preso in esame tramite opportuni test statistici.

Dall'analisi condotta nei soggetti deceduti per overdose da sostanza/e stupefacenti emerge che alcune sostanze correlano con alcuni biomarker, quindi effettivamente a seguito di una esposizione a una o più sostanze xenobiotiche si registra un aumento dei parametri dello stress ossidativo e/o della metilazione.

I parametri che mostrano più differenze tra i due gruppi in questo senso sono: rapporti tra 8Gua/Gua, 5OHMeCyt/Cyto, 5MedCyt/dCyt, 5OHMedCyt/dCyt, 8Guo/Guo, 8dGuo/dGuo. Fanno eccezione a questo andamento 5MeCyt/Cyto, 5MeCyt/Cyt, dGuo/Guo, dCyt/Cyt, dAdo/Ado dove non si riscontrano differenze significative tra gruppo di controllo e popolazione studiata.

Riguardo ai biomarker in urina studiati in questo progetto, bisogna ricordare un'elevata variabilità intra e interindividuale per tutti gli analiti, in particolare per l'8-oxo-Gua, e l'esclusione di un ritmo circadiano<sup>154,155</sup>. La variabilità dei biomarcatori potrebbe essere significativamente ridotta esprimendo i risultati in funzione della creatinina (pmol/μmolcreat) ed è stato osservato un parallelismo tra i profili di concentrazione giornaliera dei biomarcatori con quelli della creatinina urinaria, entrambi risultati che suggeriscono l'opportunità di normalizzare le concentrazioni urinarie per le concentrazioni di creatinina. Questa normalizzazione potrebbe ridurre la variabilità associata non solo alla diluizione del campione di urina, ma anche al Body Mass Index (BMI) e all'attività fisica individuale. A scopo descrittivo, le concentrazioni dei biomarcatori di ossidazione nel campione stratificato sono state espresse sia come tali (nM), che normalizzate per creatinina.

<sup>154</sup> K.F. Lee, W.Y. Chung, I.F. Benzie. Urine 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), a specific marker of oxidative stress, using direct, isocratic LC-MS/MS: method evaluation and application in study of biological variation in healthy adults. *Clin. Chim. Acta*, 411 (2010), pp. 416-422

<sup>155</sup> R. Andreoli, P. Manini, G. De Palma, R. Alinovi, M. Goldoni, W.M.A. Niessen, A. Mutti. Quantitative determination of urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-7, 8-dihydroguanine, 8-oxo-7, 8-dihydroguanosine, and their non-oxidized forms: daily concentration profile in healthy volunteers. *Biomarkers*, 15 (2010), pp. 221-231

## 6.2 ANALISI SU SALIVA – CARATTERISTICHE SOCIO-DEMOGRAFICHE

Il numero totale dei candidati volontari che hanno donato il campione di matrice salivare è di 66 persone, tutti soggetti che al momento della raccolta seguivano una terapia ed erano pazienti in carico presso il SerDP di Parma.

Per quanto riguarda i risultati sulla matrice salivare, verranno dapprima illustrati le principali caratteristiche del campione preso in esame, suddiviso per sesso, età, livello di occupazione e istruzione, e sostanze dichiarate, e successivamente le considerazioni sull'analita 8-oxo-dGuo.

Per quanto riguarda il sesso, è preponderante la componente di sesso maschile (80%) rispetto a quella femminile (20%). L'età media dei partecipanti allo studio è 41 anni, mentre l'età media di inizio della dipendenza si colloca prima dei 20 anni. Il 47% del campione risulta aver conseguito un diploma di scuola media, il 42% un diploma di scuola superiore, il 6% una laurea ed infine, il 5% un diploma di scuola elementare.

Il livello di occupazione sul totale del campione esaminato è risultato relativamente basso: solo il 38% dei candidati possiede un lavoro, di cui il 28% con un contratto determinato e il 72% con un contratto indeterminato; il restante 62% risulta senza alcuna occupazione.

Dall'analisi è emerso anche che il 50% dei soggetti risulta aver avuto precedenti penali.

È inoltre stato chiesto ai soggetti se presentassero, nel momento della donazione del campione, dipendenza da una qualsiasi sostanza: il 59% delle persone ha dichiarato di avere una dipendenza contestualmente alla raccolta.

Un altro dato importante riguarda le dichiarazioni sulla sostanza principale assunta: le sostanze maggiormente dichiarate risultano essere cocaina (34%) ed eroina (29%).

Al fine di valutare la distribuzione dei parametri analizzati più nel dettaglio, i 66 soggetti sono stati suddivisi in 4 sottogruppi stratificati per fasce d'età in modo da garantire una numerosità sufficiente e paragonabile in ogni gruppo ( $n > 10$ ):

## A) Gruppo I: 18 – 31 anni

SESSO	ETA'	TOX DIPENDENZA	SOSTANZA PRINCIPALE	ALTRE SOSTANZE ASSUNTE	LIVELLO DI ISTRUZIONE	OCCUPAZIONE	TIPOLOGIA DI CONTRATTO	PRECEDENTI PENALI	ETA' AL PRIMO ACCESSO	ETA' INIZIO DIPENDENZA
F	18	1	eroina	cocaina, ketamina, amfetamina	diploma	0		0	18	18
F	20	0	cocaina	MD, ketamina, eroina, speed	media	0		0	14	12
M	22	1	cannabis	eroina, crack, MD, ketamina, LSD, oppioidi	diploma	0		1	21	14
M	22	1	cannabis	oppiacei	media	1	indeterminato	1	15	13
M	22	1	cocaina	eroina	diploma	1	indeterminato	0	18	14
M	22	1	cannabis	0	diploma	0		1	20	17
M	23	1	crack	0	diploma	1	indeterminato	1	22	18
M	25	0	cocaina	eroina, hashish, ecstasy	media	1	indeterminato	0	25	24
M	26	1	morfina	0	diploma	1	determinato	0	24	24
M	27	1	eroina	0	diploma	0		0	27	23
M	28	1	cocaina	ketamina, acidi, oppioidi	media	0		1	16	12
M	29	0	hashish	cannabis, ketamina, LSD, speed, mescalina, MD, ecstasy, oppioidi, crack	media	1	determinato	1	23	18
M	30	1	eroina	cocaina, cannabis	diploma	1	indeterminato	1	22	17
F	30	1	alcol	0	media	1	studente	0	27	15
M	30	0	cocaina, eroina	amfetamina, LSD, ketamina, cannabis	diploma	0		1	29	17
M	30	1	MTD	0	media	1	indeterminato	1	18	16
F	31	0			laurea	0		0	30	
M	31	1	cocaina	cannabis, MD	media	1	indeterminato	0	30	14

Tabella 11: Scheda anamnestica nel Gruppo I

Il gruppo I è composto per il 78% da uomini e per il 22% da donne. Il 50% di questo campione risulta aver conseguito un diploma di scuola superiore, il 44% ha conseguito un diploma di scuola media, mentre infine solo il 6% risulta essere laureato. Il 56% dei candidati appartenenti a questo gruppo ha un lavoro, di cui il 30% possiede un contratto di tipo determinato e il 70% un contratto di tipo indeterminato; il numero di disoccupati è del 44%. Per quanto riguarda la sostanza principale, l'analisi dei dati mostra come la sostanza che viene assunta principalmente in questa fascia d'età sia la cocaina (29%), seguita da cannabis (18%) ed eroina (17%); il 6% dei candidati dichiara di non riuscire ad identificare una unica sostanza principale, e sostiene di abusare di più sostanze. I soggetti hanno dichiarato di aver assunto altre sostanze oltre a quella principale, tra le quali troviamo Ketamina (35%) ed ecstasy (29%). Infine, il 35% dei candidati ha dichiarato di non aver assunto altre sostanze oltre a quella principale. L'analisi della variabile relativa alle sostanze secondarie assunte necessita di una premessa. Poiché nella maggior parte dei casi gli intervistati riportano più di una sostanza secondaria e poiché molte di queste si ripetono tra i vari soggetti, le analisi percentuali in questo caso eccedono il valore soglia del 100%.

## B) Gruppo II: 34 – 44 anni



SESSO	ETA'	TOX DIPENDENZA	SOSTANZA PRINCIPALE	ALTRE SOSTANZE ASSUNTE	LIVELLO DI ISTRUZIONE	OCCUPAZIONE	TIPOLOGIA DI CONTRATTO	PRECEDENTI PENALI	ETA' AL PRIMO ACCESSO	ETA' INIZIO DIPENDENZA
F	34	0	cocaina, alcol, crack	eroina	media	0		0	20	20
F	35	0	cocaina	hashish, cannabis	diploma	0		0	27	25
M	35	1	cocaina	eroina	media	1	indeterminato	1	28	18
M	35	0	eroina	cocaina, ecstasy, LSD, cannabis	media	1	indeterminato	1	17	17
M	37	1	eroina	tutto	laurea	0		0	18	18
F	37	1	cocaina	hashish	diploma	0		0	36	20
M	37	0	cocaina	0	laurea	0		0	30	24
M	38	1	cocaina	eroina, LSD, MDMA, ketamina, morfina, adrenalina	media	0		1	16	16
M	39	1	cocaina	eroina ecstasy, LSD, amfetamina	media	0		0	33	14
M	39	0	eroina, cocaina	MDMA, crack	media	1	determinato	0	25	14
M	39	0	eroina	amfetamina, LSD, cocaina, ketamina, cannabis, catinoni sintetici	diploma	1	indeterminato	0	19	17
M	40	1	erba	crack	media	0		1	38	14
M	41	1	cocaina	cannabis, MDMA, eroina	diploma	1	indeterminato	1	21	18
M	42	1	cannabis	cocaina	elementare	0		1	31	17
M	42	0	cocaina	cannabis, alcol	media	0		1	32	14
M	42	1	cocaina	eroina, ecstasy, hashish, cannabis	diploma	1	indeterminato	1	20	18
M	43	0	alcol	0	diploma	0		0	37	36
M	44	0	cocaina	ecstasy, eroina, cannabis, hashish	diploma	1	indeterminato	1	16	16
M	44	0	cocaina, eroina	0	media	1	indeterminato	0	24	23

Tabella 12: Scheda anamnestica nel Gruppo II

Il gruppo II è composto per il 84% da uomini e per il 16% da donne. Il livello di istruzione risulta essere così composto: il 47% ha un diploma di scuola media, il 37% ha un diploma di scuola superiore, l'11% ha una laurea ed infine il 5% ha un livello di istruzione elementare. Per quanto riguarda l'occupazione, tra i candidati del gruppo II è emerso che il 42% possiede un lavoro, di cui il 12% con una tipologia di contratto determinato e l'88% indeterminato, mentre il 58% risulta essere disoccupato. La sostanza principalmente assunta all'interno di questo gruppo risulta essere la cocaina (53%), seguita da eroina (16%) e cannabis (11%). Oltre alla sostanza principale, anche in questo caso i candidati del gruppo II hanno dichiarato di aver assunto altre sostanze, come eroina (42%), ecstasy (42%) e cannabis (42%). Il 16% dei candidati ha dichiarato di non aver assunto altre sostanze oltre a quella principale.

### C) Gruppo III: 45 – 52 anni

SESSO	ETA'	TOX DIPENDENZA	SOSTANZA PRINCIPALE	ALTRE SOSTANZE ASSUNTE	LIVELLO DI ISTRUZIONE	OCCUPAZIONE	TIPOLOGIA DI CONTRATTO	PRECEDENTI PENALI	ETA' AL PRIMO ACCESSO	ETA' INIZIO DIPENDENZA
M	45	1	alcol	eroina, cocaina	diploma	0		1	19	19
M	45	1	eroina	hashish, cocaina, amfetamina, marijuana	media	0		1	23	16
F	45	1	eroina	cocaina, cannabis, ecstasy	diploma	0		0	18	18
M	45	0	cocaina, eroina	MD, ketamina	media	0		1	17	15
M	47	1	eroina	cocaina, fumo	media	1	determinato	0	18	15
M	48	0	eroina	cannabis, hashish, cocaina, ecstasy	media	0		0	24	20
M	48	1	alcol	cocaina, cannabis	diploma	1	indeterminato	0	46	22
M	48	1	cocaina	0	diploma	0		1	18	18
M	48	1	cocaina	0	media	1	determinato	0	20	17
M	49	1	cocaina	eroina	elementare	0		1	39	14
M	49	1	cocaina	hashish	media	0		1	21	18
F	49	1	cocaina	alcol	diploma	0		0	45	40
F	51	1	eroina	cocaina	media	0		1	31	14
M	51	1	cocaina	eroina	media	0		0	34	20
M	51	0	eroina	cannabis	media	1	indeterminato	0	20	36
M	52	0	eroina	0	media	1	indeterminato	1	32	18
M	52	0	eroina	cocaina	diploma	1	indeterminato	1	19	18

Tabella 13: Scheda anamnestica nel Gruppo III.

Il gruppo III è composto per il 82% da uomini e per il 18% da donne. Riguardo al livello di istruzione: il 59% ha un diploma di scuola media, il 35% ha un diploma di scuola superiore ed il 6% ha invece livello di istruzione elementare. Il 35% dei soggetti ha un'occupazione lavorativa, il 33% di questi hanno una tipologia di contratto determinato e il 67% indeterminato, mentre il 65% risulta disoccupato. La sostanza principale assunta è l'eroina (47%), seguita dalla cocaina (35%) e dall'alcol (12%). Oltre alla sostanza principale, il 47% dei candidati ha dichiarato di aver assunto anche cocaina, mentre il 29% cannabis. Il 18% ha dichiarato di non aver assunto altre sostanze oltre a quella principale.

#### D) Gruppo IV: 53 – 63 anni

SESSO	ETA'	TOX DIPENDENZA	SOSTANZA PRINCIPALE	ALTRE SOSTANZE ASSUNTE	LIVELLO DI ISTRUZIONE	OCCUPAZIONE	TIPOLOGIA DI CONTRATTO	PRECEDENTI PENALI	ETA' AL PRIMO ACCESSO	ETA' INIZIO DIPENDENZA
M	53	1	eroina	0	media	0		1	23	16
M	53	0	cocaina, eroina	cannabis	laurea	0		0	51	50
M	53	1	eroina	hashish	diploma	0		1	49	16
M	54	0	cocaina	eroina	elementare	0		1	31	18
F	54	0	alcol	0	diploma	0		0	53	47
M	54	1	alcol	0	media	1	determinato	0	51	44
M	57	1	eroina	cocaina, fumo, acidi	diploma	0		1	dalla fondazione	13
F	57	0	eroina, cocaina, ecstasy	LSD, ketamina	diploma	0		0	25	16
M	59	1	eroina	cocaina, amfetamina	media	0		1	18	13
F	61	0	alcol	0	diploma	0		0	58	56
M	62	0	eroina	LSD, cocaina, hashish	diploma	0		1	19	16
M	63	0	alcol	psicofarmaci	media	0		0	53	50

Tabella 14: Scheda anamnestica nel Gruppo IV

Il gruppo IV è composto dal 75% di uomini e dal 25% di donne. Il livello di istruzione relativo a questo gruppo è il seguente: il 33% ha un diploma di scuola media, il 50% ha un diploma di scuola superiore, l'8% ha una laurea ed infine l'8% ha un livello di istruzione elementare. Solo l'8% dei soggetti appartenenti al gruppo IV risulta avere un'occupazione con tipologia di contratto determinato, mentre il 92% è disoccupato. La sostanza principalmente assunta risulta essere l'eroina (42%), seguita da alcol (33%) e cocaina (8%). Il 17% ha invece dichiarato di avere più di una sostanza principale. Oltre alla sostanza principale, il 33% ha dichiarato di non assumere altre sostanze, mentre il 25% ha dichiarato di assumere cocaina ed LSD, nonché hashish (17%).

Ad una prima visione d'insieme, il dato più eclatante risulta essere la differenza netta tra i soggetti di sesso maschile rispetto a quello femminile, dimostrando, come riportato da tutti gli studi e i report sul tema delle dipendenze, che questa problematica è più predominante nei soggetti maschili e che la differenza di genere nelle dipendenze in Italia non si discosta da quella degli altri Paesi. Emerge inoltre un dato incoraggiante, soprattutto per quanto riguarda il gruppo I, che indica una maggiore propensione delle giovani donne a chiedere aiuto alle strutture preposte.

Per quanto concerne i dati relativi al livello di istruzione è emerso come la maggior parte degli intervistati risulti avere un diploma di scuola media (47%) o di scuola superiore (42%). Solo il 6% risulta

avere un titolo di studio universitario. Questi dati collocano il campione analizzato ad un livello di istruzione leggermente inferiore rispetto alla media nazionale riportata dall'Istat, secondo cui il 61,7% della popolazione tra i 25 – 64 anni ha almeno un diploma.

Riguardo ai dati sull'occupazione, dal quadro generale si può riscontrare un alto tasso di disoccupazione (64%). Inoltre, risulta che esattamente la metà dei soggetti analizzati abbia avuto precedenti penali. Questi dati dimostrano come il problema della dipendenza riguardi, nella maggior parte dei casi ma non solo, persone la cui vita è stata segnata da problemi sociali e vicende legali.

Analizzando i diversi gruppi è stato possibile riscontrare la sostanza principale assunta dai diversi candidati ed eventuali altre sostanze e, pertanto, stilare delle preferenze sulle sostanze in base alla fascia d'età.

I soggetti più giovani (gruppi I e II) hanno mostrato percentuali più alte di abuso di cocaina e cannabis, al contrario delle altre fasce di età dove invece la sostanza principale risulta essere l'eroina e alcol, dando ancora una volta credito alla teoria del passaggio o del gateway drug, ovvero la teoria secondo cui l'uso di alcune sostanze stupefacenti predisponga al futuro consumo di altre sostanze illecite.

Tale discrepanza è emersa anche per quanto riguarda altre sostanze assunte: nei primi due gruppi sono state riscontrate percentuali maggiori relative a sostanze come ketamina ed ecstasy, mentre nel terzo gruppo troviamo alcol e cannabis.

### 6.3 ANALISI SU SALIVA - BIOMARKER

In Figura 5 è riportata la curva di calibrazione in matrice utilizzata per ottenere i risultati nei campioni reali, mentre in Figura 6 vi è un cromatogramma di 8-oxo-dGuo e del suo standard interno marcato in matrice salivare ad una concentrazione di 3.12 ng/mL. Di seguito è riportata una tabella riassuntiva con le informazioni socio-anamnestiche dei soggetti coinvolti nelle analisi:

**Tabella 15.** Tabella riassuntiva con informazioni anamnestiche dei soggetti coinvolti nell'analisi della saliva e risultati bioanalitici

ID del campione	Sesso	Età	Principale sostanza d'abuso	Frequenza di assunzione (per giorno)	Altre sostanze dichiarate	Farmaci	Note	8 oxo d Guo [ng/ml]	Proteine [mg/ml]	8oxo dGuo/Proteine
1	M	49	Cocaina	3-4	Eroina	Metadone, Antidepressivi		24,6	1,8	13,8
2	F	31	ND	ND	ND	Lyrca		1,67	1,4	1,2
3	M	57	Eroina	4-5	Cocaina, THC, Acidi	Metadone, pillola per epatite C		28,4	6,1	4,6
4	M	53	Eroina	1	Nessuna	Metadone	THC ogni sera	21,5	6,5	3,3
5	F	51	Eroina	2-3	Cocaina	Metadone, Antidepressivi, Tavor		8,57	3,8	2,3
6	M	28	Cocaina	3	Ketamina, Acidi, Oppioidi	Risperidone, Metadone		7,4	1,5	5,1
7	M	27	Eroina	10	Nessuna	Subutex		15,9	0,7	23,0
8	M	37	Eroina	ND	Tutte	Prodinorfina		15,0	3,1	4,8
9	M	47	Eroina	4-5	Cocaina, THC	Metadone		11,3	1,4	8,3
10	M	22	THC	1	Eroina, Crack, MDMA, Ketamina, LSD, Oppioidi	Subutex, xilox		21,5	0,2	88,3
11	M	23	Crack	ND	Nessuna	Depakin, Olanzapina	Cocaina, Eroina a 21 anni, droghe sintetiche dall'età di 16 anni	17,7	1,0	17,4
12	M	30	Eroina	7	Cocaina, THC	Subutex, Benzodiazepine		37,0	3,3	11,1
13					Non analizzato per quantità insufficiente					
14	M	51	Cocaina	10 volte al mese	Eroina	Metadone, Lyrca		4,8	1,1	4,4
15	M	22	THC	3-4	Oppiacei	Nessuna	Giocatore d'azzardo	7,1	0,9	8,0
16	F	35	Cocaina	1	THC	Benzodiazepine, Depakin, Citalopram		3,12	1,1	2,8
17	F	57	Eroina, Cocaina, Ecstasy	4	LSD, Ketamina	Subutex, Mirtazapina, Delorazepam, Tavor, Seroquel		6,8	13,8	0,5
18	M	31	Cocaina	1 a settimana	THC, MD	Nessuna		14,9	1,4	10,3
19	M	51	Eroina	3 a settimana	THC	Metadone		25,7	1,9	13,7
20	M	59	Eroina	4	Cocaina, Amfetamina	Metadone, halcion		4,9	2,6	1,9
21	M	48	Eroina	4	THC, Cocaina, Ecstasy	Metadone		14,4	2,2	6,4
22	M	62	Eroina	8	LSD, Cocaina, THC	Tavor	Pensionato	7,5	4,2	1,8
23	M	45	Alcol	Tutti i giorni	Eroina, Cocaina	Alcover		57,9	0,5	117,1
24	M	39	Cocaina	4	Eroina Ecstasy, LSD, Amfetamina	Gtalopram, Tavor, Trittico, Stilnox, Gabapentin		6,8	1,3	5,1
25	M	44	Cocaina	1	Ecstasy, Eroina, THC	Subutex, Seroquel, Effexor		24,5	8,1	3,0
26	M	39	Eroina, Cocaina	1	MDMA, Crack	Metadone			2,6	0,0
27	M	52	Eroina	1 volta al mese	Nessuna	Metadone		4,7	1,6	2,9
28	M	30	Alcol	ogni giorno	Nessuna	Zoloft		16,6	2,1	7,9
29	F	37	Cocaina	2 volte a settimana	THC	Depakin, Tavor	Incinta	78,4	4,5	17,4
30	M	42	THC	3	Cocaina	Nessuna		QI	2,2	NC
31	M	22	Cocaina	2 volte al mese	Eroina	Depakin, Stilnox, Subutex		QI	1,5	NC
32	M	38	Cocaina	1 volta ogni 2 giorni	Eroina, LSD, MDMA, Ketamina, Morfina, Adrenalina	Antiretrovirali, Metadone, Antiepilettici		QI	7,8	NC
33	M	41	Cocaina	1 volta al mese	THC, MDMA, Eroina	Trittico		QI	1,5	NC
34	M	52	Eroina	1	Cocaina	Subutex		4,0	4,7	0,8
35	M	54	Cocaina	2	Eroina	Metadone, Psicofarmaci		8,4	3,2	2,6
36	M	25	Cocaina	1	Eroina, THC, Ecstasy	Metadone		QI	1,6	NC
37	M	29	THC	Spesso	THC, Ketamina, LSD, speed, mescalina, MD, Ecstasy, Oppio, Crack	Nesuna		93,8	2,2	42,5
38	F	18	Eroina	1	Cocaina, Ketamina, Amfetamina	Subutex		2,9	1,1	2,5
39	M	39	Eroina	1	Amfetamina, LSD, Cocaina, Ketamina, THC, Catinoni sintetici	Subutex		9,9	2,1	4,7
40	M	49	Cocaina	1	THC	Metadone, Tavor, Cardioaspirina		3,4	NC	NC
41	M	45	Eroina	3	THC, Cocaina, Amfetamina, THC	Metadone		2,2	8,0	0,3
42	M	63	Alcol	Spesso	Psicofarmaci	Antabuse, Zoloft, Seroquel, Vatran, Lyrca, Depakin	Pensionato	4,6	2,0	2,3
43	M	30	Cocaina, Eroina	7	Amfetamina, LSD, Ketamina, Cannabinoidi	Metadone		2,3	1,1	2,1
44	M	37	Cocaina	Spesso	Nessuna	Benzodiazepine		25,1	2,1	11,9
45	F	34	Cocaina, Alcol, Crack	Spesso	Eroina	Seroquel, Valium, Subutex, Vatran, Lansoprazolo, Antabuse		6,23	1,8	3,4
46	M	40	erba	>5	Crack	Nessuna		17,2	2,2	7,7
47	M	53	Cocaina, Eroina	2	THC	Subutex, Depakin, Lyrca, Tavor		QI	NC	NC
48	M	45	Eroina	3	Cocaina, THC, Ecstasy	Prozin, Depakin, Valium		QI	NC	NC
49	M	45	Cocaina, Eroina	4	MD, Ketamina	Tavor, Metadone, Trittico, Seroquel		2,1	2,3	0,9
50	M	54	Alcol	Spesso	Nessuna	Xanax, Eutirox		4,4	2,5	1,7
51	F	49	Cocaina	2 volte a settimana	Alcol	Benzodiazepine, Alcover, Antabuse, Lamictal, Lyrca, Wellbutrin		QI	NC	NC
52	M	54	Alcol	2	Nessuna	Tavor, Zoloft		1,1	2,3	0,5
53	M	48	Alcol	2 volte a settimana	Cocaina, THC	Nessuna		3,0	2,5	1,2
54	F	20	Cocaina	2 volte a settimana	MDMA, Ketamina, Eroina, Speed	Nessuna	Incinta	23,6	1,4	16,6
55	F	61	Alcol	Spesso		Zarelis, Lyrca, Cymbalta		1,58	6,0	0,3
56	M	22	THC	1	0	Calmanti		3,6	2,9	1,2
57	M	42	Cocaina	Spesso	THC, Alcol	Efexor, Depakin, Trevicta		24,7	21,2	1,2
58	M	43	Alcol	Spesso	0	Citalopram		1,4	1,9	0,7
59	M	53	Eroina	Spesso	THC	Trittico		5,1	2,1	2,4
60	M	35	Cocaina	Spesso	Eroina	Subutex		QI	NC	NC
61	M	35	Eroina	Spesso	Cocaina, Ecstasy, Acidi, THC	Metadone		QI	NC	NC
62					Non analizzato per quantità insufficiente					
63	M	48	Cocaina	1 volta a settimana	Nessuna	Seroquel		QI	NC	NC
64	M	26	morfina	1	Nessuna	Metadone		QI	NC	NC
65	M	48	Cocaina	1 volta al mese	Nessuna	Nessuna		7,5	0,8	9,6
66	M	42	Cocaina	2	Eroina, Ecstasy, THC	Metadone		QI	NC	NC
67	M	30	Metadone	1	Nessuna	Metadone		1,3	11,7	0,1
68	M	44	Cocaina, Eroina	3 volte a settimana	Nessuna	Antidepressivi		1,2	0,7	1,7

**Legenda:** ND= non dichiarata dal soggetto; QI= quantità insufficiente; NC= non calcolata per assenza di dati

Di seguito vengono riportati i risultati delle analisi dei campioni su 8-oxo-dGuo in saliva.

Risultati stratificati per analita (8-oxo-dGuo) e contenuto proteico (protein)

Nessuna differenza è stata notata tra i valori registrati di 8-oxo-dGuo tra maschi e femmine, né per i valori presi come singoli parametri, né per quanto riguarda il rapporto normalizzato per la concentrazione proteica ( denominata *Protein* nelle prossime analisi dei dati) del campione. C'è da sottolineare, come già riportato in precedenza, che il campione non risulta essere omogeneo (80%maschi, 20% femmine), per cui i risultati in questa direzione possono essere falsati dalla numerosità del campione. Vengono riportate di seguito le tabelle con l'analisi statistica:

**Group Statistics**

	Sex	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Eight_oxodGuo	Male	43	14.3349	16.95860	2.58616
	Female	9	14.7633	24.80888	8.26963
Protein	Male	43	3.1343	3.62574	.55292
	Female	9	3.8842	4.08644	1.36215
Eight_oxodGuo_protein	Male	42	10.9119	22.35553	3.44953
	Female	9	5.2222	6.76014	2.25338

**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Eight_oxodGuo	Equal variances assumed	.999	.322	-.063	50	.950	-.42845	6.75961	-14.00552	13.14862
	Equal variances not assumed			-.049	9.624	.962	-.42845	8.66458	-19.83713	18.98023
Protein	Equal variances assumed	.397	.532	-.552	50	.583	-.74994	1.35749	-3.47654	1.97665
	Equal variances not assumed			-.510	10.798	.620	-.74994	1.47009	-3.99300	2.49312
Eight_oxodGuo_protein	Equal variances assumed	.931	.339	.751	49	.456	5.68968	7.57806	-9.53901	20.91837
	Equal variances not assumed			1.381	43.170	.174	5.68968	4.12032	-2.61878	13.99815

Di seguito invece, le tabelle statistiche per quanto riguarda i risultati stratificati per sostanza, contenuto proteico e 8-oxo-dGuo (drug comparison\_parametric, intervallo di confidenza 0.95):

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	Eight_oxodGuo	Protein	Eight_oxodGuo_protein
Mann-Whitney U	156.500	182.000	153.500
Wilcoxon W	201.500	1128.000	198.500
Z	-.895	-.278	-.877
Asymp. Sig. (2-tailed)	.371	.781	.380
Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	.377 <sup>b</sup>	.794 <sup>b</sup>	.387 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Sex

b. Not corrected for ties.

Group Statistics

	Main_drug	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Eight_oxodGuo	Cocaine	14	18.3729	19.44878	5.19791
	Heroin	17	12.8806	10.06157	2.44029
Protein	Cocaine	13	3.8151	5.59715	1.55237
	Heroin	17	3.2610	2.05453	.49830
Eight_oxodGuo_protein	Cocaine	13	7.9846	5.59938	1.55299
	Heroin	17	5.5765	5.76395	1.39796

Group Statistics

	Main_drug	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Eight_oxodGuo	Cocaine	14	18.3729	19.44878	5.19791
	THC	4	31.5000	42.24950	21.12475
Protein	Cocaine	13	3.8151	5.59715	1.55237
	THC	4	1.5598	1.21315	.60657
Eight_oxodGuo_protein	Cocaine	13	7.9846	5.59938	1.55299
	THC	4	35.0000	39.86887	19.93443

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Eight_oxodGuo	Equal variances assumed	4.078	.061	-.914	16	.374	-13.12714	14.36540	-43.58043	17.32615
	Equal variances not assumed			-.603	3.371	.584	-13.12714	21.75484	-78.23971	51.98543
Protein	Equal variances assumed	1.237	.283	.783	15	.446	2.25533	2.87919	-3.88152	8.39218
	Equal variances not assumed			1.353	14.584	.197	2.25533	1.66667	-1.30594	5.81659
Eight_oxodGuo_protein	Equal variances assumed	26.241	.000	-2.551	15	.022	-27.01538	10.58917	-49.58568	-4.44509
	Equal variances not assumed			-1.351	3.036	.269	-27.01538	19.99484	-90.21737	36.18660

Group Statistics

	Main_drug	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Eight_oxodGuo	Cocaine	14	18.3729	19.44878	5.19791
	Alcohol	8	11.3225	19.48466	6.88887
Protein	Cocaine	13	3.8151	5.59715	1.55237
	Alcohol	8	2.4804	1.55088	.54832
Eight_oxodGuo_protein	Cocaine	13	7.9846	5.59938	1.55299
	Alcohol	8	16.4625	40.73812	14.40310

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Eight_oxodGuo	Equal variances assumed	.000	.998	.817	20	.423	7.05036	8.62532	-10.94175	25.04246
	Equal variances not assumed			.817	14.678	.427	7.05036	8.62987	-11.37902	25.47974
Protein	Equal variances assumed	2.627	.122	.653	19	.521	1.33470	2.04309	-2.94154	5.61094
	Equal variances not assumed			.811	14.786	.430	1.33470	1.64636	-2.17886	4.84826
Eight_oxodGuo_protein	Equal variances assumed	5.848	.026	-.751	19	.462	-8.47788	11.28983	-32.10776	15.15199
	Equal variances not assumed			-.585	7.163	.576	-8.47788	14.48658	-42.57568	25.61991

Group Statistics

	Main_drug	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Eight_oxodGuo	Heroin	17	12.8806	10.06157	2.44029
	THC	4	31.5000	42.24950	21.12475
Protein	Heroin	17	3.2610	2.05453	.49830
	THC	4	1.5598	1.21315	.60657
Eight_oxodGuo_protein	Heroin	17	5.5765	5.76395	1.39796
	THC	4	35.0000	39.86887	19.93443

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower		Upper
Eight_oxodGuo	Equal variances assumed	16.416	.001	-1.749	19	.096	-18.61941	10.64743	-40.90475	3.66592
	Equal variances not assumed			-.876	3.080	.444	-18.61941	21.26523	-85.30533	48.06650
Protein	Equal variances assumed	.999	.330	1.573	19	.132	1.70125	1.08144	-.56223	3.96473
	Equal variances not assumed			2.167	7.753	.063	1.70125	.78500	-.11905	3.52155
Eight_oxodGuo_protein	Equal variances assumed	32.268	.000	-3.170	19	.005	-29.42353	9.28159	-48.85013	-9.99693
	Equal variances not assumed			-1.472	3.030	.236	-29.42353	19.98339	-92.66992	33.82286

Group Statistics

	Main_drug	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Eight_oxodGuo	Heroin	17	12.8806	10.06157	2.44029
	Alchocol	8	11.3225	19.48466	6.88887
Protein	Heroin	17	3.2610	2.05453	.49830
	Alchocol	8	2.4804	1.55088	.54832
Eight_oxodGuo_protein	Heroin	17	5.5765	5.76395	1.39796
	Alchocol	8	16.4625	40.73812	14.40310

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower		Upper
Eight_oxodGuo	Equal variances assumed	1.684	.207	.266	23	.792	1.55809	5.84686	-10.53707	13.65324
	Equal variances not assumed			.213	8.806	.836	1.55809	7.30832	-15.03007	18.14624
Protein	Equal variances assumed	1.917	.179	.951	23	.352	.78063	.82119	-.91813	2.47938
	Equal variances not assumed			1.054	17.973	.306	.78063	.74091	-.77614	2.33739
Eight_oxodGuo_protein	Equal variances assumed	8.178	.009	-1.105	23	.281	-10.88603	9.85376	-31.27009	9.49803
	Equal variances not assumed			-.752	7.132	.476	-10.88603	14.47078	-44.97581	23.20375

Group Statistics

	Main_drug	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Eight_oxodGuo	THC	4	31.5000	42.24950	21.12475
	Alchocol	8	11.3225	19.48466	6.88887
Protein	THC	4	1.5598	1.21315	.60657
	Alchocol	8	2.4804	1.55088	.54832
Eight_oxodGuo_protein	THC	4	35.0000	39.86887	19.93443
	Alchocol	8	16.4625	40.73812	14.40310

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Eight_oxodGuo	Equal variances assumed	3.165	.106	1.164	10	.271	20.17750	17.33417	-18.44544	58.80044
	Equal variances not assumed			.908	3.654	.420	20.17750	22.21962	-43.88544	84.24044
Protein	Equal variances assumed	.023	.881	-1.031	10	.327	-.92062	.89271	-2.90972	1.06847
	Equal variances not assumed			-1.126	7.702	.294	-.92062	.81767	-2.81895	.97770
Eight_oxodGuo_protein	Equal variances assumed	.096	.763	.748	10	.472	18.53750	24.78841	-36.69452	73.76952
	Equal variances not assumed			.754	6.223	.479	18.53750	24.59331	-41.12129	78.19629

Vengono di seguito riportati una tabella descrittiva e i test non parametrici per la comparazione con le sostanze d'abuso (Drug comparison\_non parametric tests):

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
Eight_oxodGuo	Cocaine	14	18.3729	19.44878	5.19791	7.1435	29.6023	3.12	78.40
	Heroin	17	12.8806	10.06157	2.44029	7.7074	18.0538	2.20	37.00
	THC	4	31.5000	42.24950	21.12475	-35.7284	98.7284	3.60	93.80
	Crack	1	17.7000	.	.	.	.	17.70	17.70
	Alchocol	8	11.3225	19.48466	6.88887	-4.9671	27.6121	1.10	57.90
	methadone	1	1.3000	.	.	.	.	1.30	1.30
	Multiple	5	3.7260	2.58735	1.15710	.5134	6.9386	1.20	6.80
<hr/>									
Protein	Total	51	14.6588	18.35140	2.56971	9.4974	19.8202	1.10	93.80
	Cocaine	13	3.8151	5.59715	1.55237	.4328	7.1974	.78	21.21
	Heroin	17	3.2610	2.05453	.49830	2.2047	4.3173	.69	8.02
	THC	4	1.5598	1.21315	.60657	-.3706	3.4901	.24	2.91
	Crack	1	1.0170	.	.	.	.	1.02	1.02
	Alchocol	8	2.4804	1.55088	.54832	1.1838	3.7769	.50	5.97
	methadone	1	11.6570	.	.	.	.	11.66	11.66
	Multiple	6	3.7137	4.97128	2.02952	-1.5034	8.9307	.71	13.76
<hr/>									
Eight_oxodGuo_protein	Total	51	3.3000	3.70534	.51885	2.2579	4.3422	.24	21.21
	Cocaine	13	7.9846	5.59938	1.55299	4.6009	11.3683	1.20	17.40
	Heroin	17	5.5765	5.76395	1.39796	2.6129	8.5400	.30	23.00
	THC	4	35.0000	39.86887	19.93443	-28.4403	98.4403	1.20	88.30
	Crack	1	17.4000	.	.	.	.	17.40	17.40
	Alchocol	8	16.4625	40.73812	14.40310	-17.5954	50.5204	.30	117.10
	methadone	1	.1000	.	.	.	.	.10	.10
Multiple	5	1.7200	1.13225	.50636	.3141	3.1259	.50	3.40	
<hr/>									
Total		50	10.0820	20.71121	2.92901	4.1959	15.9681	.10	117.10

Ranks

		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Eight_oxodGuo	Cocaine	14	16.89	236.50
	Heroin	17	15.26	259.50
	Total	31		
Protein	Cocaine	13	13.27	172.50
	Heroin	17	17.21	292.50
	Total	30		
Eight_oxodGuo_protein	Cocaine	13	18.38	239.00
	Heroin	17	13.29	226.00
	Total	30		



Test Statistics<sup>a</sup>

	Eight_oxodGuo	Protein	Eight_oxodGuo_protein
Mann-Whitney U	106.500	81.500	73.000
Wilcoxon W	259.500	172.500	226.000
Z	-.496	-1.214	-1.570
Asymp. Sig. (2-tailed)	.620	.225	.117
Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	.625 <sup>b</sup>	.229 <sup>b</sup>	.123 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Main\_drug

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Main_drug	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Eight_oxodGuo	Cocaine	14	9.50	133.00
	THC	4	9.50	38.00
	Total	18		
Protein	Cocaine	13	9.54	124.00
	THC	4	7.25	29.00
	Total	17		
Eight_oxodGuo_protein	Cocaine	13	8.42	109.50
	THC	4	10.88	43.50
	Total	17		

Test Statistics<sup>a</sup>

	Eight_oxodGuo	Protein	Eight_oxodGuo_protein
Mann-Whitney U	28.000	19.000	18.500
Wilcoxon W	38.000	29.000	109.500
Z	.000	-.793	-.850
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.428	.395
Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	1.000 <sup>b</sup>	.477 <sup>b</sup>	.412 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Main\_drug

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Main_drug	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Eight_oxodGuo	Heroin	17	10.74	182.50
	THC	4	12.13	48.50
	Total	21		
Protein	Heroin	17	12.00	204.00
	THC	4	6.75	27.00
	Total	21		
Eight_oxodGuo_protein	Heroin	17	10.12	172.00
	THC	4	14.75	59.00
	Total	21		

Test Statistics<sup>a</sup>

	Eight_oxodGuo	Protein	Eight_oxodGuo_protein
Mann-Whitney U	29.500	17.000	19.000
Wilcoxon W	182.500	27.000	172.000
Z	-.403	-1.523	-1.343
Asymp. Sig. (2-tailed)	.687	.128	.179
Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	.698 <sup>b</sup>	.144 <sup>b</sup>	.203 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Main\_drug

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Main_drug	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Eight_oxodGuo	Cocaine	14	13.71	192.00
	Alchocol	8	7.63	61.00
	Total	22		
Protein	Cocaine	13	10.23	133.00
	Alchocol	8	12.25	98.00
	Total	21		
Eight_oxodGuo_protein	Cocaine	13	13.27	172.50
	Alchocol	8	7.31	58.50
	Total	21		

Test Statistics<sup>a</sup>

	Eight_oxodGuo	Protein	Eight_oxodGuo_protein
Mann-Whitney U	25.000	42.000	22.500
Wilcoxon W	61.000	133.000	58.500
Z	-2.116	-.724	-2.138
Asymp. Sig. (2-tailed)	.034	.469	.033
Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	.035 <sup>b</sup>	.500 <sup>b</sup>	.030 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Main\_drug

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Main_drug	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Eight_oxodGuo	Heroin	17	14.76	251.00
	Alchocol	8	9.25	74.00
	Total	25		
Protein	Heroin	17	13.82	235.00
	Alchocol	8	11.25	90.00
	Total	25		
Eight_oxodGuo_protein	Heroin	17	14.59	248.00
	Alchocol	8	9.63	77.00
	Total	25		

Test Statistics<sup>a</sup>

	Eight_oxodGuo	Protein	Eight_oxodGuo_protein
Mann-Whitney U	38.000	54.000	41.000
Wilcoxon W	74.000	90.000	77.000
Z	-1.748	-.816	-1.573
Asymp. Sig. (2-tailed)	.081	.415	.116
Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	.086 <sup>b</sup>	.440 <sup>b</sup>	.124 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Main\_drug

b. Not corrected for ties.

Ranks

	Main_drug	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Eight_oxodGuo	THC	4	8.75	35.00
	Alcohol	8	5.38	43.00
	Total	12		
Protein	THC	4	5.50	22.00
	Alcohol	8	7.00	56.00
	Total	12		
Eight_oxodGuo_protein	THC	4	8.63	34.50
	Alcohol	8	5.44	43.50
	Total	12		

Test Statistics<sup>a</sup>

	Eight_oxodGuo	Protein	Eight_oxodGuo_protein
Mann-Whitney U	7.000	12.000	7.500
Wilcoxon W	43.000	22.000	43.500
Z	-1.529	-.679	-1.446
Asymp. Sig. (2-tailed)	.126	.497	.148
Exact Sig. [2* (1-tailed Sig.)]	.154 <sup>b</sup>	.570 <sup>b</sup>	.154 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: Main\_drug

b. Not corrected for ties.

Infine, viene riportata di seguito la tabella che mostra la correlazione tra età, contenuto proteico e 8-oxo-dGuo in saliva:

**Correlations**

			Age	Eight_oxodGuo	Protein	Eight_oxodGuo_protein
Spearman's rho	Age	Correlation Coefficient	1.000	-.163	.425**	-.414**
		Sig. (2-tailed)	.	.247	.002	.003
		N	53	52	52	51
	Eight_oxodGuo	Correlation Coefficient	-.163	1.000	.027	.803**
		Sig. (2-tailed)	.247	.	.849	.000
		N	52	52	51	51
	Protein	Correlation Coefficient	.425**	.027	1.000	-.513**
		Sig. (2-tailed)	.002	.849	.	.000
		N	52	51	52	51
	Eight_oxodGuo_protein	Correlation Coefficient	-.414**	.803**	-.513**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.003	.000	.000	.
		N	51	51	51	51

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Le modificazioni epigenetiche in risposta alle droghe d'abuso stanno emergendo come un campo promettente nello studio dell'alterazione dei modelli di metilazione del DNA in specifici siti promotori di geni e nell'intero genoma. Un numero crescente di prove suggerisce l'importanza della metilazione del DNA nella tossicodipendenza.

Anche nel presente studio è stato dimostrato che i cambiamenti nei modelli di metilazione sono associati all'assunzione di droghe d'abuso, ma non è ancora chiaro se le alterazioni siano legate anche alla predisposizione o soltanto all'effetto dell'abuso di tali sostanze.

Dalla letteratura riportata emerge l'evidenza che tutte le lesioni derivanti da stress ossidativo giocano un ruolo fondamentale nell'eziologia e/o patogenesi di molte malattie come cancro e invecchiamento, risultando particolarmente dannose per il sistema respiratorio, cardiovascolare e nervoso.

Quella del ruolo specifico dello stress ossidativo nell'invecchiamento e nello sviluppo delle malattie legate all'età è un'area di ricerca in continua evoluzione, ma i meccanismi esatti che possono definire questa relazione complessa non sono chiari: ad esempio, dovrebbero essere condotti studi più approfonditi e specifici per i geni al fine di scoprire chiaramente come il consumo materno e, più in generale, dei genitori di droghe e alcol influisca sulla prole. Integrando fattori ereditari e ambientali, l'epigenetica aggiunge una nuova e più completa dimensione psicobiologica alla spiegazione degli effetti del trauma. Si avvalorano sempre più la tesi secondo cui le modificazioni epigenetiche, e gli effetti che ne scaturiscono, siano anche trasmessi per via transgenerazionale. Dalla letteratura esaminata emerge come vari studi menzionino gli effetti intergenerazionali di droghe o alcol che l'abuso ha generato sulla metilazione del DNA nella prole, attraverso l'esposizione fetale dei genitori. Sebbene diverse ricerche siano state condotte su modelli animali, pochissimi sono stati condotti su soggetti umani con storia di dipendenza da alcol o droghe, come nel presente studio pilota.

Esistono molti studi che affrontano i cambiamenti nella metilazione del DNA dovuti al consumo individuale di droghe e alcol, ma altri devono ancora essere condotti sull'uomo e sugli animali, e dovrebbero mirare sia al promotore del gene che alle alterazioni della metilazione globale del DNA. Tali ricerche, mediante un opportuno approfondimento dei biomarcatori, potrebbero essere utilizzati per l'individuazione di valori utili al monitoraggio del processo di de-dipendenza e astinenza dalle sostanze. Pertanto, il collegamento della metilazione del DNA in risposta a farmaci e alcol può portare allo sviluppo di nuovi biomarcatori sensibili e tessuto-specifici per fare una diagnosi precoce.

Come è noto anche dalla letteratura sopra esposta, il metabolismo e l'assorbimento di composti endogeni ed esogeni aumentano la conta dei metaboliti ossidati, che a loro volta potrebbero portare a danni ossidativi. In condizioni fisiologiche, l'eliminazione delle specie ossidanti ROS da parte dei sistemi antiossidanti mantiene l'equilibrio ossidativo. Quando tale equilibrio si sposta a favore delle specie ossidanti, si verifica lo stress ossidativo e le lesioni ossidative si accumulano, a causa del processo di formazione della lesione che sovrasta i processi di riparazione e di turnover molecolare da parte di sistemi *ad hoc*.

I campi di applicazione dei biomarker di stress ossidativo sono numerosi, come ad esempio in tossicologia, spaziando dalla tossicologia clinica a quella occupazionale o ambientale, richiedendo l'utilizzo di metodiche nuove, non invasive e affidabili in studi epidemiologici su larga scala, volti a monitorare sia la dose, che gli effetti precoci derivanti dall'esposizione ad agenti ossidanti. Per quanto riguarda il loro significato ai fini applicativi, esso dipende anche dal contesto specifico in cui viene utilizzato il test e, come abbiamo visto in precedenza, tale significato può essere applicato con successo in lavoratori esposti ad inquinanti ambientali, o in campioni di età pediatrica, al fine di monitorare il livello di stress ossidativo.

Sulla base di queste premesse, potremmo considerare questi biomarker come *biomarker di effetto*, cioè una misurabile alterazione biochimica, fisiologica o di altro tipo all'interno di un organismo che, a seconda dell'entità, può essere riconosciuta come un danno o una malattia accertata o potenziale<sup>156</sup>.

È stata riscontrata un'elevata variabilità dei livelli di 8-oxo-dGuo nel campione, che si conferma essere uno dei parametri più variabili; questa variabilità potrebbe essere ascritta, almeno in parte, al polimorfismo genetico (Ser326Cys) del gene BER hOGG1, che mostra una prevalenza di circa il 20% nei caucasici e ha conseguenze funzionali sull'attività enzimatica<sup>157,158</sup>. La localizzazione citoplasmatica

<sup>156</sup>National Research Council Biological Markers in Reproductive Toxicology, Natl. Acad. Press, Washington, DC (1989), p. 395

<sup>157</sup>L. Marchand, T. Donlon, A. Lum-Jones, A. Seifried, L.R. Wilkens. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 11 (2002), pp. 409-412

<sup>158</sup> A. Bravard, M. Vacher, E. Moritz, L. Vaslin, J. Hall, B. Epe, J.P. Radicella. Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity. *Cancer Res.*, 69 (2009), pp. 3642-3649

dell'RNA, insieme alle sue proprietà strutturali (a filamento singolo; basi non protette da legami idrogeno né da proteine strutturali), lo rendono più suscettibile agli insulti ossidativi rispetto al DNA.

Inoltre, gli isoenzimi del citocromo P450, coinvolti nella biotrasformazione di fase I della maggior parte delle sostanze xenobiotiche, e localizzati nel reticolo endoplasmatico, possono essere responsabili della generazione di ROS, che portano infine all'ossidazione dell'RNA citoplasmatico.

In questa popolazione non abbiamo riscontrato un aumento correlato all'età delle concentrazioni di 8-oxo-dGuo come valori singoli.

L'unica correlazione provata statisticamente con l'età riguarda i livelli più alti di contenuto proteico riscontrati nei campioni ( $r=0.425$ ,  $p=0.002$ ). Data però l'associazione con le proteine come denominatore, è stato possibile correlare l'età con il rapporto 8-oxo-dGuo/contenuto proteico ( $r=-0.414$ ,  $p=0.003$ ; distribuzione non-normale dei dati, Spearman's ranked correlations). L'età è dunque un fattore di interferenza significativo in queste misurazioni ed un aumento dello stress ossidativo correlato all'età è stato ampiamente documentato nella letteratura scientifica<sup>159</sup>. Tra le possibili spiegazioni vi sono la ridotta efficienza dei sistemi antiossidanti e la possibile modificazione della funzione mitocondriale. Inoltre, è stata anche riportata una riduzione dipendente dall'età di hOGG1, il principale enzima coinvolto nella rimozione dell'8-ossoguanina<sup>160</sup>, e ciò può portare all'accumulo di prodotti di ossidazione nel DNA.

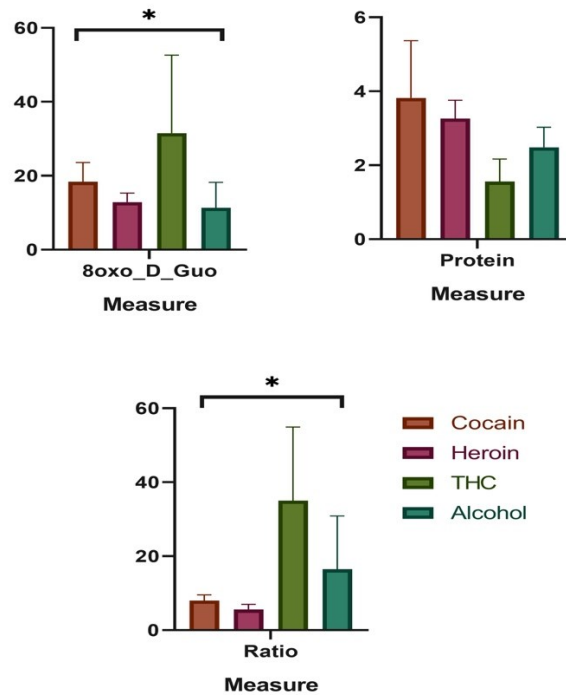
Sono state inoltre eseguite comparazioni tra quelle sostanze che avevano una numerosità sufficiente statisticamente come "popolazione dati" (con l'eccezione del poliabuso di droghe).

In quest'analisi, i soggetti che dichiarano l'assunzione di cocaina mostrano valori di 8-oxo-dGuo significativamente differenti se comparati a coloro che assumono alcol; inoltre si evidenzia lo stesso trend positivo e di correlazione tra i valori di 8-oxo-dGuo di chi consuma eroina se comparato con chi consuma alcol. Esisterebbe, perciò, una differenza statisticamente significativa nei valori di 8-oxo-dGuo tra soggetti che usano cocaina e alcol, dato che rimane comunque da confermare con una casistica più ampia.

Molti soggetti hanno dichiarato assunzione di THC, ma i valori associati di 8-oxo-dGuo mostrano una variazione troppo grande per poter attribuir loro un significato statistico definito, come mostrato nella seguente Figura 16:

<sup>159</sup>Olinski R., Siomek A., Rozalski R., Gackowski D., Foksinski M., Guz J., Dziaman T., Szpila A., Tudek B. Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim. Pol.*, 54 (2007), pp. 11-26

<sup>160</sup>S.K. Chen, W.A. Hsieh, M.H. Tsai, C.C. Chen, A.I. Hong, Y.H. Wei, W.P. Chang. Age-associated decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOgg1), in human aging. *J. Radiat. Res.*, 44 (2003), pp. 31-35.



**Figura 16:** comparazione tra droghe d'abuso, 8-oxo-dGuo e contenuto proteico

\* - dati statisticamente significativi con p-value inferiore a 0.05 (non parametric-data, Mann-Whitney U test)

L' 8-oxo-dGuo è il biomarker urinario più studiato di acidi nucleici danneggiati ossidativamente, ma i meccanismi che contribuiscono alla sua presenza nelle matrici biologiche, ed in particolare nella matrice salivare, non sono stati ancora completamente chiariti e i relativi ruoli del metabolismo, della malattia e della dieta devono essere adeguatamente affrontati; inoltre, tali incongruenze sono state talvolta attribuite ai diversi metodi analitici utilizzati ed è necessario un ulteriore sforzo per raggiungere l'armonizzazione tra i diversi metodi proposti per la sua determinazione.

## CONCLUSIONI

Sintetizzando, in questo studio pilota, su campioni urinari di soggetti deceduti, con un passato di consumo di sostanza d'abuso e che erano in terapia presso il servizio per le dipendenze, sono state trovate alcune correlazioni tra biomarkers e sostanze d'abuso:

- analiti come la Creatinina, 5OHMedCyt, Guo, dGuo, e i rapporti tra 8-oxo-Gua/Gua, 5OHMedCyt/Cyto, 8Guo/Guo, 8dGuo/dGuo potrebbero dare un'indicazione sullo stress ossidativo e alterazione dei processi di metilazione provocati dall'abuso di una o più sostanze: in particolare i valori di Gua e 5OHMedCyt sembrano essere correlati ad assunzione di tutte le sostanze in modo positivo, eccetto che per le benzodiazepine;
- 1-MeGua correla positivamente con i soggetti che abusano di morfina, mentre dCyt e 5-MedCyt correlano positivamente esclusivamente con soggetti che fanno abuso di cocaina, morfina e thc.

Per quanto riguarda, invece, gli studi in saliva su popolazione vivente e in terapia con metadone presso il SerDP (al momento della raccolta del campione) di Parma, è stata evidenziata alta variabilità di 8-oxo-dGuo nei campioni, probabilmente in parte legata al polimorfismo genetico. Inoltre, non è stata riscontrata una correlazione fra età e livelli di 8-oxo-dGuo come singole concentrazioni, ma con il rapporto 8-oxo-dGuo/contenuto proteico, dimostrando che l'età è un importante fattore interferente in queste misurazioni.

Dalle comparazioni eseguite, gli assuntori di cocaina mostrano valori di 8-oxo-dGuo significativamente differenti se comparati ad assuntori di alcol; simile trend si evidenzia tra i valori di 8-oxo-dGuo di eroinomani se comparati ad assuntori di alcol. I valori associati di 8-oxo-dGuo mostrano, invece, una variazione troppo grande in assuntori di THC per trarre delle conclusioni con significato statistico.

Sebbene alti livelli di danno ossidativo siano stati trovati in presenza simultanea di diverse malattie e in seguito ad esposizioni a sostanze tossiche, dimostrare una precisa correlazione tra i prodotti di ossidazione e l'incidenza delle malattie e, di conseguenza, l'utilizzo di queste sostanze come indicatori di danno biologico, necessita di ulteriori studi e dell'esame di vari aspetti, come i metodi di analisi, i fattori di confondimento (fumo, dieta, età, sesso etc), l'interpretazione dei dati e il bisogno di valori di riferimento che permettano di determinare la soglia tra un danno precoce e uno effettivo.

Nonostante si sia ben lontani dall'identificazione certa di un singolo biomarker specifico (o rapporto di essi) per quantificare e/o predire il danno ossidativo da sostanze d'abuso, siamo riusciti comunque ad



osservare associazioni tra alcune sostanze di abuso e indicatori di danno ossidativo e di metilazione degli acidi nucleici.

In particolare, è stato possibile quantificare gli indicatori di metilazione e di ossidazione escreti in forma libera nelle urine e di 8-oxo-dGuo (indicatore di ossidazione) nella matrice salivare tramite metodiche semplici ed efficaci come punto di partenza per ulteriori approfondimenti. Proprio perché tali indicatori sono di recente scoperta, e sapendo che sono legati alla metilazione, la loro interpretazione biologica può essere associata a meccanismi di iper- o ipo-metilazione, e sono pertanto necessari studi futuri che diano significato a tali indicatori e alle concentrazioni.

I cambiamenti epigenetici, monitorati dai biomarker della metilazione del DNA in risposta a determinate droghe d'abuso, potrebbero essere potenzialmente utilizzati come importante prova nei casi di morte per overdose, omicidi intenzionali o casi di suicidio.

Lo scenario globale della tossicodipendenza mostra che le persone tendono ad assumere più droghe contemporaneamente, il che richiede lo sviluppo di nuovi modelli per eseguire un'analisi completa di alterazioni della metilazione in risposta a farmaci o sostanze, che possano ulteriormente far comprendere come ottenere una risposta più affidabile da questi biomarker.

Per quanto riguarda gli obiettivi futuri, inoltre, sarebbe auspicabile approfondire la relazione tra il danno subito (tramite determinazione di indicatori presenti nel sangue) e quello riparato (indicatori determinati nelle urine).

Ulteriori sviluppi in questo campo dovrebbero includere, tra gli altri: (i) informazioni definitive sull'origine dei biomarker, in particolare di 8-oxoGuo, la cui idoneità come biomarker di agenti di stress ossidativo dovrebbe includere sperimentazioni tra persone esposte a vari tipi di insulti e stress (vedasi radiazioni ionizzanti) e (ii) un'estensione del test ad altri biomarker simili, tra cui 5,6-diidrossi-5,6-diidrotimina, 5-(idrossimetil)uracile e nucleosidi correlati, che hanno dimostrato di essere generati nel DNA cellulare.

In conclusione, questo progetto ha studiato le concentrazioni e correlazioni di un pannello di biomarker indotti ossidativamente in due popolazioni e due matrici diverse, fornendo un contributo alla definizione di valori e delle concentrazioni di tali biomarker. Viene anche dimostrato il ruolo dell'età e del sesso come fattori di interferenza. La Tossicodipendenza, i cui comportamenti sono influenzati da fattori genetici e ambientali, sembra essere un interessante percorso di ricerca; essa dipende da diversi fattori e cause che richiedono la necessità di contributi multidisciplinari. L'epigenetica della tossicodipendenza e dell'abuso può rappresentare, in tal senso, un approccio molecolare e multidisciplinare per affrontare il problema.

Studiare, perciò, l'effetto dell'abuso di droghe sui livelli di metilazione di specifiche regioni del promotore del gene in varie fasi e la manipolazione dell'espressione genica, può portare al livello successivo nella comprensione dei meccanismi epigenetici, aprendo così la strada a nuove frontiere per la ricerca terapeutica ed investigativa.

## Bibliografia

1. DOBZHANSKY T. (1937) Genetics and the origin of species. Columbia U.P., New York.
2. PROVINE W. B. (1971) The origins of theoretical population genetics. The University of Chicago Press, Chicago.
3. JORDHEIM, L., DURANTE, D., ZOULIM, F. et al. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nat Rev Drug Discov* 12, 447–464 (2013). <https://doi.org/10.1038/nrd4010>.
4. DABROWSKA, 2012 Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin exp Med*, 26 (1); 155-156.
5. BARBIERI, 2009 Valutazione del danno da stress ossidativo come indicatore di effetto biologico dell'esposizione professionale a xenobiotici. Università di Bologna.
6. LL, W. (2004). Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetes. *Clin Chim Acta*, 339 (1-2):1-9
7. Joseph LUNEC, Karen A. HOLLOWAY, Marcus S. COOKE, Steve FAUX, Helen R. GRIFFITHS, Mark D. EVANS, Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? This article is part of a series of reviews on "Oxidative DNA Damage and Repair." *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 33, Issue 7, 2002, Pages 875-885, ISSN 0891-5849, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00882-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00882-1).
8. Marcus S. COOKE, Lars BARREGARD, Vilas MISTRY, Neelam POTDAR, Rafal ROZALSKI, Daniel GACKOWSKI, Agnieszka SIOMEK, Marek FOKSINSKI, Peter SVOBODA, Hiroshi KASAI, Justin C. KONJE, Gerd SALLSTEN, Mark D. EVANS & Ryszard OLINSKI, (2009) Interlaboratory comparison of methodologies for the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, *Biomarkers*, 14:2, 103-110
9. Marcus S. COOKE, Tiago L. DUARTE, Deborah COOPER, Jie CHEN, Sridevi NANDAGOPAL, Mark D. EVANS, Combination of azathioprine and UVA irradiation is a major source of cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, *DNA Repair*, Volume 7, Issue 12, 2008, Pages 1982-1989, ISSN 1568-7864, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.08.007>.
10. George PERRY, Arun K. RAINA, Akihiko NUNOMURA, Takafumi WATAYA, Lawrence M. SAYRE, Mark A. SMITH, How important is oxidative damage? Lessons from Alzheimer's disease, *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 28, Issue 5, 2000, Pages 831-834, ISSN 0891-5849, [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00158-1](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00158-1).
11. WILSON S., JONES L., COUSEENS C., et al, The Links Between Environmental Factors, Genetics, and the Development of Cancer, in *Cancer and the Environment: Gene-Environment Interaction*, (2002).
12. LANGE S., GALLAGHER M., KHOLIA S. et al, Peptidylarginine Deiminases-Roles in Cancer and Neurodegeneration and Possible Avenues for Therapeutic Intervention via Modulation of Exosome and Microvesicle (EMV) Release?, in *Int J Mol Sci.* (2017); 18(6): 1196.
13. ROBINSON G. E., FERNALD R. D., CLAYTON D. F., Genes and Social Behavior, in *Science*.(2008); 322(5903): 896–900.
14. BIELAWSKI T., MISIAK B., MOUSTAFA A., FRYDECKA D., Epigenetic mechanisms, trauma and psychopathology: targeting for chromatin remodeling complexes, in *Nature Reviews Neuroscience* (2019) 30 (6): 595-604.
15. TRONICK E., HUNTER R.G., Waddington, Dynamic Systems, and Epigenetics. *Front Behav. Neuroscience*. 2016 Jun 10;10:107. doi: 10.3389/fnbeh.2016.00107. PMID: 27375447; PMCID: PMC4901045.
16. NELSON D. L., COX M M, I Principi di Biochimica di Lehninger (2014).
17. NELSON (2014) Random-Primed, Phi29 DNA Polymerase-Based Whole Genome Amplification. *Current Protocols in Molecular Biology*.
18. WILSON S., JONES L., COUSEENS C., et al, The Links Between Environmental Factors, Genetics, and the Development of Cancer, in *Cancer and the Environment: Gene-Environment Interaction*, (2002).
19. STEIN 2012, Hybridization Analysis of Histone Messenger RNA: Association with Polyribosomes During the Cell Cycle, *Science* Vol 189, Issue 4202•pp. 557-558
20. Meng H, Cao Y, Qin J, et al. DNA methylation, its mediators and genome integrity. *Int J Biol Sci.* 2015;11(5):604-617. Published 2015 Apr 8. doi:10.7150/ijbs.11218
21. XIADONG, 2001, Adomet-dependent methylation, dNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic Acids Research*, Vol 29, 18, 3784-3795
22. ZENG, H., QI, C.-B., LIU, T., XIAO, H.-M., CHENG, Q.-Y., JIANG, H.-P., FENG, Y.-Q. (2017). Formation and Determination of Endogenous Methylated Nucleotides in Mammals by Chemical Labeling Coupled with Mass Spectrometry Analysis. *Analytical Chemistry*, 89(7), 4153–4160. doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00052
23. FUKS F., HURD P.J., DEPLUS R., KOUZARIDES T., The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res.* 2003 May 1;31(9):2305-12. doi: 10.1093/nar/gkg332. PMID: 12711675; PMCID: PMC154218.
24. CZAJA W., MAO P., SMERDON M.J., The emerging roles of ATP-dependent chromatin remodeling enzymes in nucleotide excision repair. *Int J Mol Sci.* 2012;13(9):11954-73. doi: 10.3390/ijms130911954. Epub 2012 Sep 20. PMID: 23109894; PMCID: PMC3472786.
25. FOLEY, J.E., MAEDER, M.L., PEARLBERG, J., JOUNG, J.K., PETERSON, R.T., and YEH, J.R. (2009), Targeted mutagenesis in zebrafish using customized zinc-finger nucleases. *Nature Protocols*. 4(12):1855-1867.

26. SETO E., YOSHIDA M., Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes, in *Cold Spring Harb Perspect Biol.* (2014); 6(4).
27. SHAABAN S. A., BEDFORD M. T., Reprogramming the histone code (2007), in *Chemistry & Biology* 14: 242-244.
28. KAWASAKI H., SCHILTZ L., CHIU R., ITAKURA K., TAIRA K., NAKATANI Y., YOKOYAMA K. K., ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation, in *Nature* (2000); 405(6783):195-200.
29. SCHNEIDER A., CHATTERJEE S., BOUSIGES O., SELVI B. R., SWAMINATHAN A., CASSEL R., BLANC F., KUNDU T. K., BOUTILLIER A. L., Acetyltransferases (HATs) as targets for neurological therapeutics, in *Neurotherapeutics*.2013 Oct; 10(4):568-88.
30. SAWICKA A., SEISER C., Histone H3 phosphorylation – A versatile chromatin modification for different occasions, in *Biochimie* (2012); 94(11): 2193–2201.
31. TYAGI M., IMAM N., VERMA K., PATEL A. K., Chromatin remodelers: We are the drivers!!, in *Nucleus* (2016);7(4):388–404.
32. NARLIKAR G. J., SUNDARAMOORTHY R., OWEN-HUGHES, Mechanisms and Functions of ATP-Dependent Chromatin-Remodeling Enzymes, in *Cell* (2013); 154(3): 490–503.
33. BECKER P. B., HORZ W., ATP-Dependent Nucleosome Remodeling, *Annual Review of Biochemistry* (2002) 71: 247-273.
34. MAZINA M. Y., VOROBYEVA N. E., The role of ATP-dependent chromatin remodeling complexes in regulation of genetic processes, in *Genetika* (2016);52 (5):529-40.
35. HU W., COLLER J., What comes first: translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function, in *Cell Res* (2012); 22(9): 1322-1324.
36. DĄBROWSKA N., W. A. (2012). Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin Exp Med*, 26(1), 155-166.
37. HU C W., Liu H H., L. J. et al. (2012). Direct Analysis of 5 Methylcytosine and 5 Methyl deoxycytidine in Human Urine by Isotope Dilution LC MS/MS: Correlations with N Methylated Purines and Oxidized DNA Lesions. *Chem. Res. Toxicol*, 25, 462-470.
38. Vairapandi, M., and Duker, N. J. (1993) Enzymic removal of 5- methylcytosine from DNA by a human DNA-glycosylase. *Nucleic Acids Res.* 21, 5323–5327.
39. Vairapandi, M., and Duker, N. J. (1996) Partial purification and characterization of human 5-methylcytosine-DNA glycosylase. *Oncogene* 13, 933–938.
40. Barreto, G., Schafer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S. K., Handa, V., Doderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F., and Niehrs, C. (2007) Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445, 671–675.
41. Bhattacharya, S. K., Ramchandani, S., Cervoni, N., and Szyf, M. (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397, 579–583.
42. Zhu, J. K. (2009) Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* 43, 143–166.
43. JACOB K.D. , Hooten N.N., TRZECIAK A.R. , EVANS M.K., Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. Volume 134, Issues 3–4, March–April 2013, Pages 139-157.
44. HU C.W., LIU H.H., L. J. et al. (2012), Direct Analysis of 5 Methylcytosine and 5 Methyl deoxycytidine in Human Urine by Isotope Dilution LC MS/MS: Correlations with N Methylated Purines and Oxidized DNA Lesions. *Chem. Res. Toxicol*, 25, 462-470.)
45. World Health Organization, *Mental Health and Older Adults*. Geneva: WHO (2013).
46. SHARON A, LEVAV I, BRODSKY J, SHEMESH A A, Kohn R, Psychiatric disorders and other health dimensions among Holocaust survivors 6 decades later, *Br J Psychiatry* (2009); 195:331–35.
47. FRUMKIN D, WASSERSTROM A, DAVIDSON A, GRAFIT A, Authentication of forensic DNA samples, in *Forensic Sci Int Genet.* (2010); 4 (2): 95-103.
48. LEE Y, AN H, JUNGE, et al, Genome-wide methylation profiling and a multiplex construction for the identification of body fluids using epigenetic markers, in *Forensic Sci Int Genet* (2015); 17:17–24.
49. LAWLOR E R, THIELE C J, Epigenetic changes in pediatric solid tumors: promising new targets, in *Clinic Cancer Res* (2012) 15; 18 (10): 2768-2779.
50. Lovreglio P, Stufano A, Andreoli R, Tomasi C, Cagnazzi P, Barbieri A, Soleo L, De Palma G. Urinary biomarkers of nucleic acid oxidation and methylation in workers exposed to low concentrations of benzene. *Toxicol Lett.* 2020 Oct 1;331:235-241. doi: 10.1016/j.toxlet.2020.06.010. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32562636.
51. Andreoli R, Manini P, De Palma G, Alinovi R, Goldoni M, Niessen WM, Mutti A. Quantitative determination of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 8-oxo-7,8-dihydroguanosine, and their non-oxidized forms: daily concentration profile in healthy volunteers. *Biomarkers.* 2010 May;15(3):221-31. doi: 10.3109/13547500903434501. PMID: 19958079.
52. Protano C, Astolfi ML, Canepari S, Andreoli R, Mutti A, Valeriani F, Romano Spica V, Antonucci A, Mattei V, Martellucci S, Vitali M. Exposure to individual and multiple carcinogenic metals during paediatric age: an experience from an Italian urban scenario. *Ann Ig.* 2017 Nov-Dec;29(6):494-503. doi: 10.7416/ai.2017.2180. PMID: 29048448.

53. Andreoli R, Spatari G, Pigini D, Poli D, Banda I, Goldoni M, Riccelli MG, Petyx M, Protano C, Vitali M, Barbaro M, Mutti A. Urinary biomarkers of exposure and of oxidative damage in children exposed to low airborne concentrations of benzene. *Environ Res.* 2015 Oct;142:264-72. doi: 10.1016/j.envres.2015.07.003. Epub 2015 Jul 14. PMID: 26186134.
54. Andreoli R, Protano C, Manini P, De Palma G, Goldoni M, Petyx M, Rondinone BM, Vitali M, Mutti A. Association between environmental exposure to benzene and oxidative damage to nucleic acids in children. *Med Lav.* 2012 Sep-Oct;103(5):324-37. PMID: 23077793
55. BUTLER G., Definitions of stress, in *Occas Pap R Coll Gen Pract.* (1993); (61): 1–5.
56. ROBINSON G. E., FERNALD R. D., CLAYTON D. F., Genes and Social Behavior, in *Science.*(2008); 322(5903): 896–900.
57. BIELAWSKI T., MISIAK B., MOUSTAFA A., FRYDECKA D., Epigenetic mechanisms, trauma and psychopathology: targeting for chromatin remodeling complexes, in *Nature Reviews Neuroscience* (2019) 30 (6): 595-604
58. Cfr. MUCCI C., Trauma e perdono, una prospettiva psicoanalitica intergenerazionale, in Raffaello Cortina Editore (2014).
59. BACHMANN A.W., SEDGLEY T L, JACKSON R.V., GIBSON J N, YOUNG R M, TORPY D J, Glucocorticoid receptor polymorphisms and post-traumatic stress disorder. *Psychoneuroendocrinology* (2005) 30(3), 297–306
60. SABBAGH J J, et al, Targeting the FKBP51/GR/Hsp90 Complex to Identify Functionally Relevant Treatments for Depression and PTSD, in *ACS Chem Biol.* (2018), 13 (8): 2288-2299
61. UDDIN M., AIELLO A.E., WILDMAN D.E. et al., Epigenetic and immune function profiles associated with post-traumatic stress disorder, in *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (2010), 107(20): 9470– 9475
62. BARCELONA DE MENDOZA V, HUANG Y, CRUSTO C A, SUN Y V, TAYLOR J Y, Perceived Racial Discrimination and DNA Methylation Among African American Women in the InterGEN Study, in *Biol Res Nurs* (2018); 20(2): 145-152.
63. FULLGRABE J, HAJJI N, JOSEPH B Cracking the death code: apoptosis-related histone modifications, in *Cell death Differ* (2010); 17(8): 1238-43.
64. YEHUDA R, LEHRNER A, Intergenerational transmission of trauma effects: putative role of epigenetic mechanisms, in *World Psychiatry* (2018); 17(3): 243-257
65. LOPEZP, CASTRO A, FLOREZ M, MIRANDA K, ARANDA P, SANCHEZ-GONZALEZ C, LLOPIS J, ARREDONDO M, miR-155 and miR-122 Expression of Spermatozoa in Obese Subjects, in *Front Genet* (2018); 9: 175
66. DICKSON D A, PAULUS J K, MENSAH V, LEM J, SAAVEDRA-RODRIGUEZ L, GENTRY A, PAGIDAS K, FEIG L A, Reduced levels of miRNAs 449 and 34 in sperm of mice and men exposed to early life stress, in *Transl Psychiatry* (2018); 8(1): 101.
67. DICKSON D A, PAULUS J K, MENSAH V, LEM J, SAAVEDRA-RODRIGUEZ L, GENTRY A, PAGIDAS K, FEIG L A, Reduced levels of miRNAs 449 and 34 in sperm of mice and men exposed to early life stress, in *Transl Psychiatry* (2018); 8(1): 101
68. COSTA D L, Scarring and mortality selection among civil war pawns: A long term mortality, morbidity and socio-economic follow-up, in *Demography* (2012); 49: 1185–1206.
69. PERSSON P, ROSSIN-SLATER M, Family ruptures, stress, and the mental health of the next generation. *Am Econ Rev* (2018); 108:1214–1252
70. WEINSTOCK M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun.* (2005); 19:296–308.
71. MARTIN-GRONERT M S, OZANNE SE. Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring. *Biochem Soc Trans.* (2006); 34: 779–82.
72. YOUNGSON N A, WHITELAW E, Transgenerational epigenetic effects. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2008); 9: 236-238
73. MEANEY M J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annu Rev Neurosci.* (2001); 24: 1161–92
74. YOUNGSON N A, WHITELAW E, Transgenerational epigenetic effects. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2008); 9: 236-238
75. YEHUDA R, LEHRNER A, Intergenerational transmission of trauma effects: putative role of epigenetic mechanisms, in *World Psychiatry* (2018); 17(3): 243–257
76. MATEOS-APARICIO P, RODRIGUEZ-MORENO A, The Impact of Studying Brain Plasticity, in *Front Cell Neurosci.* (2019); 13: 66.
77. MATEOS-APARICIO P, RODRIGUEZ-MORENO A, The Impact of Studying Brain Plasticity, in *Front Cell Neurosci.* (2019); 13: 66.
78. BARLOW C, TARGUM PhD ShD, Hippocampal Neurogenesis, in *Psychiatry (Edgmont)* (2007); 4(5): 18–20.
79. SENKOWSKI D, HOFLE M, ENGEL A K, Crossmodal shaping of pain: a multisensory approach to nociception, in *Trends Cogn Sci.* (2014); 18(6): 319-27.
80. RODGERS A B, MORGAN C P, Leu N A, Bale T L, Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress, in *Proc Natl Acad Sci USA* (2015) 3;112(44):13699-704
81. RODGERS A B, MORGAN C P, Leu N A, Bale T L, Transgenerational epigenetic programming via sperm microRNA recapitulates effects of paternal stress, in *Proc Natl Acad Sci USA* (2015) 3;112(44):13699-704.
82. KANDEL, SCHWARTZ, JESSELL, SIEGELBAUM, HUDSPETH, Principi di neuroscienze (2014).

83. RAFLER N H, *The criminal brain: Understanding biological theories of crime*. New York University Press (2008).
84. WALSH A, BEAVER K M, *Biosocial criminology: New directions in theory and research*: Routledge (2009).
85. VIDING E, LARSSON H, JONES A P, Quantitative genetic studies of antisocial behaviour in *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* (2008); 363: 2519-2527.
86. TREMBLAY R E, SZYF M, Developmental origins of chronic physical aggression and epigenetics, in *Epigenomics* (2010); 2(4): 495- 499.
87. TREMBLAY R E, Developmental origins of disruptive behaviour problems: the 'original sin' hypothesis, epigenetics and their consequences for prevention. *Journal of Child Psychology & Psychiatry* (2010); 51(4): 341-367
88. TREMBLAY R E, Developmental origins of disruptive behaviour problems: the 'original sin' hypothesis, epigenetics and their consequences for prevention. *Journal of Child Psychology & Psychiatry* (2010); 51(4): 341-367.
89. SIEVER L J, Neurobiology of aggression and violence, in *American Journal of Psychiatry* (2008); 165: 429-442
90. CRAIG I W, HALTON K E, Genetics of human aggressive behaviour, in *Human Genetics* (2009); 126: 101-113
91. TERBURG D, MORGAN B, VAN HONK J. The testosterone cortisol ratio: A hormonal marker for proneness to social aggression, in *International Journal of Law and Psychiatry* (2009); 32: 216-223
92. FERGUSSON D M, BODEN J M, HORWOOD L J, MILLER A L, KENNEDY M A, MAOA, abuse exposure and antisocial behaviour: 30-year longitudinal study, in *Br J Psychiatry*, (2011);198(6): 457-63
93. TARDIFF K, SWEILLAM A, Assault, suicide, and mental illness, in *Archives of General Psychiatry* (1980); 37(2): 164-169.
94. MONAGHAN E, GLICKMAN S, Hormones and aggressive behaviour, in Becker J, Breedlove S, Crews D, (Eds.), *Behavioral endocrinology* (1992).
95. C.C.Y. Wong, J. Mill, C. Fernandes, Drugs and addiction: an introduction to epigenetics, *Addiction* 106 (2011) 480–489, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1360-0443.2010.03321.x>]
96. TSANKOVA N M, BERTON O, RENTHAL W, KUMAR A, NEVE R L, NESTLER E J, Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action, in *Nat Neurosci* (2006); 9: 519-25.
97. *J Neuroimmune Pharmacol* (2013) 8:1181–1196 DOI 10.1007/s11481-013-9508-y
98. D. Sulzer, How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission, *Neuron* 69 (2011) 628–649, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.010>
99. D. Sulzer, How addictive drugs disrupt presynaptic dopamine neurotransmission, *Neuron* 69 (2011) 628–649, <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.02.010>
100. J.J. Day, D. Childs, M.C. Guzman-Karlsson, M. Kibe, J. Moulden, E. Song, A. Tahir, J.D. Sweatt, DNA methylation regulates associative reward learning, *Nat. Neurosci.* 16 (2013) 1445–1452, <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3504>
101. S.J. Russo, E.J. Nestler, The brain reward circuitry in mood disorders, *Nat. Rev. Neurosci.* 14 (2013) 609–625, <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3381>
102. M.M. Torregrossa, P.R. Corlett, J.R. Taylor, Aberrant learning and memory in addiction, *Neurobiol. Learn. Mem.* 96 (2011) 609–623, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nlm.2011.02.014>.
103. KHOURY L, TANG Y L, BRADLEY B, CUBELLS J F, RESSLER K J, Substance use, childhood traumatic experience, and Posttraumatic Stress Disorder in an urban civilian population, in *Depress Anxiety* (2010); 27(12): 1077-1086
104. MICHPOULOS V, ROTHBAUM A O, Jovanovic T et al., Association of CRP genetic variation and CRP level with elevated PTSD symptoms and physiological responses in a civilian population with high levels of trauma, in *Am. J. Psychiatry* (2015); 172(4): 353-362.
105. NAGANO-SAITO A, DAGHER A, BOOIJ L et al. Stress-induced dopamine release in human medial prefrontal cortex--18F-fallypride/PET study in healthy volunteers, in *Synapse.* (2013);67(12): 821-830
106. Renthall W, Nestler EJ. Epigenetic mechanisms in drug addiction. *Trends Mol Med.* 2008 Aug;14(8):341-50. doi: 10.1016/j.molmed.2008.06.004. Epub 2008 Jul 16. PMID: 18635399; PMCID: PMC2753378.
107. *Molecular Pharmacology Fast Forward*. Published on February 25, 2014 as DOI: 10.1124/mol.114.091728
108. CORRADINI B, ALÙ M, SANCHEZ-DIZ P, ESTANY-GESTAL A, LICATA M, VANDELLI D, BEDUSCHI G, CARRACEDO A, FERRI G, Genetica delle dipendenze in *Medicina Legale: analisi di mutazioni associate allo sviluppo da dipendenza da nicotina e cannabis*, Atti XXIII. Convegno Nazionale di Genetisti Forensi Italiani (Ge.F.I.), in *Genetica Forense e diritto: prospettive scientifiche, tecnologiche e normative* (2010).
109. EFIMOVA O A, KOLTSOVA A S, KRAPIVIN M I, TIKHONOV A V, PENDINA A A, Environmental Epigenetics and Genome Flexibility: Focus on 5-Hydroxymethylcytosine, in *Int JMol Sci.* (2020); 2:21(9).
110. Sami, M. B., & Bhattacharyya, S. (2018). Are cannabis-using and non-using patients different groups? Towards understanding the neurobiology of cannabis use in psychotic disorders. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 32(8), 825–849. <https://doi.org/10.1177/0269881118760662>
111. Murphy, T., Matheson, J., Mann, R. E., Brands, B., Wickens, C. M., Tiwari, A. K., Zai, C. C., Kennedy, J., & Le Foll, B. (2021). Influence of Cannabinoid Receptor 1 Genetic Variants on the Subjective Effects of Smoked Cannabis. *International journal of molecular sciences*, 22(14), 7388. <https://doi.org/10.3390/ijms22147388>



112. AGRAWAL A, WETHERILL L, DICK D M, XUEI X, HINRICHS A, HESSELBROCK V, KRAMER J, NUMBERGER J I Jr, SCHUCKITN M, BIERUT L J, EDENBERG H J, FOROUD T, Evidence for association between polymorphisms in the cannabinoid receptor 1 (CNR1) gene and cannabis dependence, in *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* (2009); 150 B(5): 736-40.
113. Genome-wide association study implicates CHRNA2 in cannabis use disorder | *Nature Neuroscience*
114. Genome-wide association study implicates CHRNA2 in cannabis use disorder | *Nature Neuroscience*
115. McLaughlin P, Mactier H, Gillis C, Hickish T, Parker A, Liang WJ, Osselton MD. Increased DNA Methylation of ABCB1, CYP2D6, and OPRM1 Genes in Newborn Infants of Methadone-Maintained Opioid-Dependent Mothers. *J Pediatr.* 2017 Nov;190:180-184.e1. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.07.026. Epub 2017 Sep 1. PMID: 28867064.
116. Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28
117. Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28
118. Marissa A Bernstein, Sandra P Welch,  $\mu$ -Opioid receptor down-regulation and cAMP-dependent protein kinase phosphorylation in a mouse model of chronic morphine tolerance, *Molecular Brain Research*, Volume 55, Issue 2, 1998, Pages 237-242, ISSN 0169-328X, [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00005-9).
119. Yin et al, 2006. Morphine promotes Jurkat cell apoptosis through pro-apoptotic FADD/P53 and anti-apoptotic PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B pathways
120. In Vivo Regulation of Extracellular Signal-Regulated Protein Kinase (ERK) and Protein Kinase B (Akt) Phosphorylation by Acute and Chronic Morphine Daniella L. Muller and Ellen M. Unterwald *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* August 1, 2004, 310 (2) 774-782; DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.104.066548>
121. Goudas, Leonidas C. MD, PhD<sup>\*</sup>; Langlade, Agnes MD, PhD<sup>‡</sup>; Serrie, Alain MD, PhD<sup>‡</sup>; Matson, Wayne<sup>§</sup>; Milbury, Paul<sup>§</sup>; Thurel, Claude MD<sup>‡</sup>; Sandouk, Pierre MD<sup>||</sup>; Carr, Daniel B. MD, FABPM<sup>\*†</sup> Acute Decreases in Cerebrospinal Fluid Glutathione Levels after Intracerebroventricular Morphine for Cancer Pain, *Anesthesia & Analgesia*: November 1999 - Volume 89 - Issue 5 - p 1209-1215 doi: 10.1213/00000539-199911000-00023
122. Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28
123. Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28
124. Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28
125. Memorie associative. *BIOL PSYCHIATRY* 2014;76:57–65
126. VAHER K, ANIER K, JURGENSON M, HARRO J, KALDA A, Cocaine-induced changes in behaviour and DNA methylation in rats are influenced by inter-individual differences in spontaneous exploratory activity, in *J Psychopharmacol* (2020).
127. G.F. Koob, Alcoholism: allostasis and beyond, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 27 (2003) 232–243, <http://dx.doi.org/10.1097/01.ALC.0000057122.36127.C2>
128. V. Nieratschker, A. Batra, A.J. Fallgatter, Genetics and epigenetics of alcohol dependence, *J. Mol. Psychiatry* 1 (2013) 11, <http://dx.doi.org/10.1186/2049-9256-1-11>.
129. S.D. Shukla, J. Velazquez, S.W. French, S.C. Lu, M.K. Ticku, S. Zakhari, Emerging role of epigenetics in the actions of alcohol, *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32 (2008) 1525–1534, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1530-0277.2008.00729.x>.
130. Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28
131. Mutation Research-Reviews in Mutation Research 777 (2018) 19–28
132. Protano, C., Andreoli, R., Mutti, A., Petti, S., & Vitali, M. (2014). Biomarkers of oxidative stress to nucleic acids: Background levels and effects of body mass index and life-style factors in an urban paediatric population. *Science of the Total Environment*, 500–501, 44–51. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.095
133. Manini, P., De Palma, G., Andreoli, R., Goldoni, M., & Mutti, A. (2004). Determination of urinary styrene metabolites in the general Italian population by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 77(6), 433–436. doi.org/10.1007/s00420-004-0526-1
134. Vianello (2008) Sviluppo di una metodologia analitica per la determinazione degli amminoacidi contenuti nei leganti a base proteica utilizzati nella pittura a tempera, mediante HPLC-MS/MS. Venezia.
135. J. Cadet, H. Poulsen. Measurement of oxidatively generated base damage in cellular DNA and urine. *Free Radic. Biol. Med.*, 48 (2010), pp. 1457-1459
136. Barbieri A. (2009). Valutazione del danno da stress ossidativo come indicatore di effetto biologico dell'esposizione professionale a xenobiotici. Università di Bologna.
137. Dąbrowska N., W. A. (2017). Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin Exp Med*, 26(1), 155–166
138. Hu, C-W., Cooke, M.S., Tsai Y., Chao, M.R. (2015). 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine concentrations in various human body fluids: implications for their measurement and interpretation. *Arch Toxicol* (2015) 89:201–210
139. Andreoli R., Mutti A., Goldoni M., Manini P., Apostoli P., D. P. G. (2011). Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (2'-deoxy) ribonucleotides and nucleic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 50, 254–261.

140. Andreoli R., Mutti A., Goldoni M., Manini P., Apostoli P., D. P. G. (2011). Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (2'-deoxy) ribonucleotides and nucleic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 50, 254–261.
141. Hu C-W., Liu H-H., L. Y.-J. et al. (2012). Direct Analysis of 5-Methylcytosine and 5-Methyl-2'-deoxycytidine in Human Urine by Isotope Dilution LC-MS/MS: Correlations with N-Methylated Purines and Oxidized DNA Lesions. *Chem. Res. Toxicol*, 25, 462–470.
142. BARBIERI A. (2009). Valutazione del danno da stress ossidativo come indicatore di effetto biologico dell'esposizione professionale a xenobiotici. Università di Bologna.
143. DĄBROWSKA N., W. A. (2017). Analytics of oxidative stress markers in the early diagnosis of oxygen DNA damage. *Adv Clin Exp Med*, 26(1), 155–166
144. Biomarkers of Exposure, Effect and Susceptibility to Environmental and Occupational Chemicals. Manosij GHOSH, Radu CORNELIU DUCA, *Frontiers Media SA, Frontiers in Public Health and Frontiers in Genetics*.
145. FRANZINI M., FORNACIARI I., FIERABRACCI V., SUPERIORE S., ANNA S., SPERIMENTALE P., & MEDICHE B. (2009). Indici di laboratorio di stress ossidativo. *LigandAssay*, 14(2)
146. HU C-W., COOKE M.S., TSAI Y., CHAO, M.R.(2015). 8-Oxo-7,8-dihydroguanine and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine concentrations in various human body fluids: implications for their measurement and interpretation. *Arch Toxicol* (2015) 89:201–210
147. PROTANO C., ANDREOLI R., MUTTI A., PETTI S., & VITALI M. (2014). Biomarkers of oxidative stress to nucleic acids: Background levels and effects of body mass index and life style factors in an urban paediatric population. *Science of the Total Environment*, 500 501, 44 51. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.095.
148. FRANZINI M., FORNACIARI I., FIERABRACCI V., SUPERIORE S., ANNA S., SPERIMENTALE P., & MEDICHE B. (2009). Indici di laboratorio di stress ossidativo. *LigandAssay*, 14(2).
149. ANDREOLI R., MUTTI A., GOLDONI M., MANINI P., APOSTOLI P., D. P. G. (2011). Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (deoxy) ribonucleotides and nucleic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, 50, 254–261.
150. HU C W., LIU H. H., L. J. et al. (2012). Direct Analysis of 5 Methylcytosine and 5 Methyl deoxycytidine in Human Urine by Isotope Dilution LC MS/MS: Correlations with N Methylated Purines and Oxidized DNA Lesions. *Chem. Res. Toxicol*, 25, 462 470.
151. PROTANO C., ANDREOLI R., MUTTI A., PETTI S., & VITALI M. (2014). Biomarkers of oxidative stress to nucleic acids: Background levels and effects of body mass index and life-style factors in an urban paediatric population. *Science of the Total Environment*, 500–501, 44–51. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.095.
152. GINDRO (2016). Creatinina nel sangue: alta, bassa e valori normali. <https://www.valorinormali.com/sangue/creatinina/>
153. Tamae, K., Kawai, K., Yamasaki, S., Kawanami, K., Ikeda, M., Takahashi, K. Kasai, H. (2009). Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Science*, 100(4), 715–721. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01088.x>
154. K.F. Lee, W.Y. Chung, I.F. Benzie. Urine 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG), a specific marker of oxidative stress, using direct, isocratic LC-MS/MS: method evaluation and application in study of biological variation in healthy adults. *Clin. Chim. Acta*, 411 (2010), pp. 416–422
155. R. Andreoli, P. Manini, G. De Palma, R. Alinovi, M. Goldoni, W.M.A. Niessen, A. Mutti. Quantitative determination of urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-7, 8-dihydroguanine, 8-oxo-7, 8-dihydroguanosine, and their non-oxidized forms: daily concentration profile in healthy volunteers. *Biomarkers*, 15 (2010), pp. 221–231
156. National Research Council Biological Markers in Reproductive Toxicology, Natl. Acad. Press, Washington, DC (1989), p. 395
157. L. Marchand, T. Donlon, A. Lum-Jones, A. Seifried, L.R. Wilkens. Association of the hOGG1 Ser326Cys polymorphism with lung cancer risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 11 (2002), pp. 409–412
158. A. Bravard, M. Vacher, E. Moritz, L. Vaslin, J. Hall, B. Epe, J.P. Radicella. Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity. *Cancer Res.*, 69 (2009), pp. 3642–3649
159. Olinski R., Siomek A., Rozalski R., Gackowski D., Foksinski M., Guz J., Dziaman T., Szpila A., Tudek B. Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochim. Pol.*, 54 (2007), pp. 11–26
160. S.K. Chen, W.A. Hsieh, M.H. Tsai, C.C. Chen, A.I. Hong, Y.H. Wei, W.P. Chang. Age-associated decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOgg1), in human aging. *J. Radiat. Res.*, 44 (2003), pp. 31–35.