

S.S. Cancerogenesi Ambientale

Bioindicatori e Biomarcatori nella valutazione dell'inquinamento ambientale da agenti mutageni e cancerogeni

Linea di ricerca: 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

Programma: a - Fattori di rischio esogeni ed endogeni e loro eventuali interazioni

Responsabile scientifico: Claudia Bolognesi

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Paola Roggeri, Andrea Sciutto

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: bioindicatori; biomarcatori; genotossicità; cromo; tossine algali; *Mytilus galloprovincialis*

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Epidemiologia e Biostatistica (V. Fontana)

Altri Enti coinvolti: Agenzia Regionale Protezione Ambiente Liguria, ARPAL, Genova (R. Bertolotto, P. Moretto); Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta, Sezione di Genova (B. Vivaldi, L. Masiello); Dip di Scienze dell'Ambiente e della Vita, Università del Piemonte Orientale (A. Viarengo)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Soggetti cofinanziatori: ARPA Liguria; Ministero della Salute; Presidenza del Consiglio dei Ministri Dip. Protezione Civile

Background

Le più recenti strategie per la valutazione delle alterazioni di un ecosistema si basano sull'integrazione delle analisi chimiche con una serie di indicatori biologici.

Il monitoraggio di un ampio numero di effetti precoci: biochimici, fisiologici, genetici (biomarcatori) in organismi sentinella (bioindicatori) permette di determinare la biodisponibilità ed il bioaccumulo degli inquinanti, fornendo una risposta integrata degli ecosistemi acquatici ai fattori di stress ambientale. Questo nuovo approccio di biomonitoraggio, determinando segnali di allarme precoce, permette di prevedere con anticipo l'impatto ambientale, offrendo un utile strumento all'individuazione di fonti inquinanti ed alla programmazione di adeguate misure di protezione.

I bioindicatori devono essere specie rappresentative per ruolo ecologico, di facile reperibilità e mantenimento e informativi per l'area di campionamento.

I molluschi bivalvi sono organismi sessili filtratori ad elevato potere di bioaccumulo e bassa velocità di detossificazione degli inquinanti e rappresentano i "bioindicatori" ideali ampiamente utilizzati nei programmi di monitoraggio dell'ambiente acquatico: i mitili per le aree marine costiere e le ostriche per le maggiori profondità, la Dreissena per l'acqua dolce.

Crostacei e differenti specie di pesci con caratteristiche stanziali sono anche considerati come bioindicatori per la valutazione del bioaccumulo e della biomagnificazione degli inquinanti.

Differenti biomarcatori di genotossicità sono stati applicati nei bivalvi e nei pesci, ma solo un numero limitato di questi sono stati validati sul campo e sono applicati in programmi di biomonitoraggio. Ad oggi batterie di biomarcatori sono applicati in differenti specie in associazione alla determinazione nelle acque, nei sedimenti e/o nei tessuti degli stessi organismi dei principali inquinanti nelle aree in studio. E' importante definire il ruolo predittivo dei diversi bioindicatori e biomarcatori, la loro sensibilità e specificità nel rilevare l'esposizione a diversi inquinanti o classi di inquinanti ed avviare programmi di standardizzazione dei protocolli sperimentali e di intercalibrazione della metodica.

I molluschi bivalvi per la loro caratteristica di filtratori sono in grado di accumulare anche concentrazioni rilevanti di tossine e costituire quindi una potenziale fonte di esposizione degli animali marini attraverso la catena alimentare ed un rischio potenziale, non ancora definito per i consumatori. I dinoflagellati bentonici produttori di potenti tossine, quali la palitossina o suoi analoghi, presenti nelle zone tropicali e subtropicali, da un limitato numero di anni, hanno colonizzato zone temperate come il Mediterraneo e costituiscono un problema per la salute umana. Dal 2005 la fioritura di *Osteopsis ovata*, produttore di ovatossina è stata più volte registrata sul litorale della Liguria, Puglia, Lazio e Sicilia, imponendo un controllo dei molluschi bivalvi. Le caratteristiche tossicologiche e genotossiche ed il meccanismo d'azione delle palitossine e dell'ovatossina in particolare e la loro potenziale interazione con gli altri inquinanti non sono state ad oggi definite.

Per quanto riguarda il monitoraggio del suolo non sono stati identificate specie sentinella idonee a rivelare la presenza ed il bioaccumulo di inquinanti genotossici e/o cancerogeni.

Recenti studi sperimentali suggeriscono la potenzialità di utilizzare specie di vermi, quali *Eisenia fetida* come bioindicatori per determinare la genotossicità del suolo. I celomociti, cellule con potenzialità di fagocitosi ed immunitarie, facilmente prelevabili con meccanismo di estrusione, sono particolarmente esposte agli inquinanti e possono essere considerati come tessuto surrogato per la determinazione dei biomarcatori.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

- Standardizzazione e validazione di biomarcatori di genotossicità in specie sentinella in studi di monitoraggio ambientale

Programmazione 2009-2011

- Definizione della sensibilità e specificità dei bioindicatori e biomarcatori nel rilevare inquinanti o classi di inquinanti genotossici e/o cancerogeni dell'ambiente marino.
- Valutazione del profilo tossicologico e della potenziale genotossicità delle tossine algali di interesse per le aree costiere italiane. Validazione di un sistema in vitro per la determinazione degli effetti tossici rilevanti.

Impatto assistenziale certo o potenziale

La definizione della tossicità e/o genotossicità dell'ovatossina è rilevante per valutare il rischio potenziale associato all'esposizione umana.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

A) Bioaccumulo del cromo e/o di altri metalli pesanti attraverso l'applicazione di una batteria di biomarcatori di genotossicità. I biomarcatori considerati includono test di danno al DNA e danno cromosomico ed i componenti principali della risposta adattativa al danno ossidativo, quali gli enzimi antiossidanti catalasi (CAT), superossido dismutasi (SOD) e glutatone perossidasi.

Tali parametri verranno valutati nei mitili come specie sentinella stabulati in diversi periodi dell'anno in aree contaminate dalla presenza di cromo e correlati alla concentrazione del metallo determinata nell'acqua e nei tessuti degli animali stessi.

B) Determinazione della potenzialità dei bioindicatori e biomarcatori nel predire il danno a lungo termine indotto da un massiccio sversamento di petrolio, nell'ambito di un progetto pilota attuato nell'area del relitto della petroliera Haven al largo di Arenzano.

Sono stati condotti diversi campionamenti nel tempo dal periodo immediatamente successivo all'incidente fino al momento della prospezione e della bonifica. Le ostriche sono state considerate come bioindicatori, in quanto animali stanziali dell'area in studio. Campioni di ostriche provenienti da allevamenti sono stati stabulati in gabbie fisse e galleggianti in diverse zone sul relitto e prelevati dopo 28 giorni insieme a campioni di animali stanziali da due aree del relitto. Nello stesso periodo venivano anche prelevati pesci stanziali (*Mullus barbatus*) nell'area del relitto e in una zona di riferimento. In questi animali sono stati valutati il danno al DNA e danno cromosomico nei tessuti bersaglio, cellule branchiali per le ostriche, eritrociti, cellule epatiche e cellule branchiali nei pesci. Verranno ancora programmati due ulteriori campionamenti a 6 mesi ed 1 anno dalla bonifica. Il programma di campionamento si concluderà alla fine del 2010. Verrà quindi effettuata un'analisi statistica complessiva dei risultati ottenuti con i differenti biomarcatori di genotossicità e fisiologici (eseguiti presso il Dip di Scienze dell'Ambiente e della Vita dell'Università di Alessandria) al fine dell'espressione di un indice di rischio.

C) Valutazione e caratterizzazione del profilo tossicologico delle tossine algali isolate nei periodi di fioritura nelle aree costiere italiane.

Verrà dato particolare rilievo agli effetti ed ai meccanismi d'azione già identificati per altre molecole analoghe, quali ad esempio la palitossina. Si valuteranno parametri di tossicità, quali alterazioni morfologiche, di vitalità cellulare, la presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS), l'entità della perossidazione lipidica. Si studierà quindi l'attività genotossica con differenti test (test del micronucleo, Comet assay), e su diversi sistemi cellulari che permettano di evidenziare differenze filogenetiche di sensibilità alle tossine. Obiettivo di questa indagine è quello di mettere a punto una batteria di saggi in vitro di valutazione degli effetti tossici più rilevanti per le molecole in studio in alternativa all'uso degli animali di laboratorio. Questa batteria dovrà essere validata con composti di riferimento quali la palitossina o altri in rapporto alla quale potrà essere definita l'attività dei campioni di origine ambientale.

D) Applicazione e standardizzazione del test del micronucleo nei celomociti dei vermi della specie *Eisenia fetida* ai fini di un suo potenziale utilizzo nella determinazione dell'inquinamento del suolo da parte di agenti genotossici. Determinazione della specificità del test nel monitoraggio di diversi inquinanti o classi di inquinanti.

Le attività previste per il 2009 comprendono:

A) Conduzione di due campionamenti di monitoraggio ambientale in due periodi dell'anno (primavera ed autunno) utilizzando mitili stabulati in due diverse aree nell'ambito del sito Cogoletto-Stoppani al fine di determinare le variazioni nell'induzione di danno genotossico indotto dal cromo in rapporto alle concentrazioni di Cr III e Cr VI determinate nei tessuti e nell'acqua e ai parametri fisiologici. Verrà considerato il livello predittivo dei diversi biomarcatori al fine di standardizzare i successivi campionamenti.

B) Conduzione di un campionamento nel periodo estivo nell'area della petroliera Haven. Ostriche provenienti da un allevamento controllato verranno stabulate in gabbie fisse e galleggianti in 5 diverse aree del relitto per un periodo di 28 giorni. Questi animali e campioni di ostriche stanziali prelevate in due aree del relitto ed animali di controllo stabulati in un'area non inquinata (Portofino) verranno processati per l'analisi del danno al DNA e danno cromosomico nelle cellule branchiali. Nello stesso periodo verranno prelevati campioni di pesci (*Mullus barbatus*) nell'area in studio ed in una zona di riferimento per la determinazione degli stessi parametri di genotossicità nelle cellule epatiche, negli eritrociti circolanti e nelle cellule branchiali. Si prevede di effettuare un'analisi statistica dei risultati ottenuti nei diversi campionamenti condotti a partire dal 2004 confrontando i parametri di genotossicità, fisiologici con le concentrazioni dei principali inquinanti determinate in campioni di omogenati degli animali in toto.

C) In merito alla caratterizzazione del profilo tossicologico delle tossine algali, verranno effettuati test di tossicità in vitro utilizzando la palitossina purificata e differenti estratti da tessuti di mitili campionati nelle aree costiere liguri durante i periodi di fioritura algale. Verranno inizialmente considerate linee cellulari epatiche di origine umana e dotate di competenza metabolica (HepG2). Si valuteranno parametri di tossicità, quali alterazioni morfologiche, di vitalità cellulare (colorazione con Neutral Red o con Trypan blu), la presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS), l'entità della perossidazione lipidica. La valutazione della genotossicità comprenderà test di danno al DNA (determinazione di rotture sulla singola elica mediante Comet assay) e di danno cromosomico (test del micronucleo).

D) Il test del micronucleo verrà applicato sui celomociti di *Eisenia fetida*. Questo studio sarà svolto in collaborazione con il Dip di Scienze dell'Ambiente e della Vita, Università del Piemonte Orientale (Prof. A. Viarengo), responsabile dell'allevamento e del trattamento degli animali. Sarà standardizzato il protocollo sperimentale di preparazione delle cellule ed allestimento dei preparati per la valutazione al microscopio e verranno definiti i criteri di identificazione delle cellule e dei micronuclei.

Programmazione 2009-2011

I risultati attesi per il 2009 comprendono:

- A) Definizione del ruolo dei diversi biomarcatori di genotossicità (Danno al DNA, danno cromosomico, ROS, enzimi del danno ossidativo) nel rilevare l'inquinamento da cromo, riferito anche all'influenza dei fattori stagionali.
- B) Determinazione degli effetti della bonifica attraverso una comparazione dei risultati ottenuti riferiti allo stato di salute degli organismi indicatori (Ostriche e pesci) nei diversi campionamenti.
- C) Definizione della tossicità e potenziale genotossicità, in termini di danno al DNA e frequenza di micronuclei, su cellule HepG2 coltivate in vitro, di alcuni estratti di ovattossina in comparazione con la palitossina.
- D) Definizione del protocollo sperimentale del test del micronucleo in celomociti di *Eisenia fetida*.

Track record

Bolognesi C.-Perrone E.-Roggieri P.-Pampanin D.M.-Sciutto A.

Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions.

Aquat. Toxicol. 78 Suppl 1:S93, 2006

Bolognesi C.-Perrone E.-Roggieri P.-Sciutto A.

Bioindicators in monitoring long term genotoxic impact of oil spill: Haven case study.

Mar. Environ. Res. 62 Suppl:S287/289, 2006

Viarengo A.-Dondero F.-Pampanin D.-Fabbri R.-Poggi E.-Malizia M.-Bolognesi C.-Perrone E.-Gollo E.-Cossa G.

A biomonitoring study assessing the residual biological effects of pollution caused by the HAVEN wreck on marine organisms in the Ligurian sea (Italy).

Arch. Environ. Contam. Toxicol. 53:607/616, 2007

Viarengo A.-Lowe D.-Bolognesi C.-Fabbri E.-Koehler A.

The use of biomarkers in biomonitoring: a 2 tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms.

Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 146:281/300, 2007

Standardizzazione e validazione di biomarcatori di genotossicità nel monitoraggio di popolazioni umane esposte ad agenti genotossici

Linea di ricerca: 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

Programma: b - Biomarcatori biologici e molecolari di esposizione, di danno, di suscettibilità e di rischio di cancro

Responsabile scientifico: Claudia Bolognesi

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Paola Roggieri, Andrea Sciutto

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: biomarcatori; test del micronucleo; Comet assay; danno cromosomico

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Epidemiologia Clinica (P. Bruzzi)

Altri Enti coinvolti: Istituto Nazionale di Fisica Nucleare (laboratori di Frascati); Programma HUMN (HUMAN MicroNucleus - The International Collaborative Project on Micronucleus Frequency in Human Populations)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Soggetti cofinanziatori: Organizzazione degli Stati Americani (OSA)

Background

I biomarcatori di genotossicità applicati a differenti cellule target o surrogato sono da tempo applicati nella valutazione di potenziali rischi associati ad esposizioni professionali od ambientali.

Il test del micronucleo inizialmente messo a punto per la determinazione di effetti clastogeni e di aneuploidia è stato quindi esteso alla valutazione di una serie di parametri citogenetici e cellulari, quali ponti nucleoplasmici, buds, apoptosi e necrosi e ad effetti di tossicità secondo un nuovo protocollo di analisi che è oggi denominato "Cytome assay".

L'applicazione del test ai linfociti periferici coltivati in vitro con successivo blocco della citodieresi consente di considerare l'effetto di esposizioni recenti rispetto al prelievo. Il protocollo sperimentale è stato standardizzato ed ampiamente convalidato da un esercizio di intercalibrazione condotto a livello internazionale. Questo consente una comparazione dei risultati tra laboratori e la conduzione di studi di correlazione.

Le cellule esfoliate della mucosa ottenute facilmente con metodi non invasivi hanno rappresentato una valida alternativa ai linfociti di sangue periferico nella determinazione della frequenza di micronuclei in popolazioni esposte in

Programmazione 2009-2011

modo continuo ad agenti genotossici per via inalatoria o per il monitoraggio dell'efficacia di trattamenti di chemioprevenzione. Tuttavia la sensibilità e la predittività del test nelle sue diverse modalità di applicazione non è stata ad oggi determinata. E' inoltre necessaria una standardizzazione del protocollo ed un esercizio di intercalibrazione tra laboratori al fine di una comparabilità dei risultati.

Una delle applicazioni più importanti dei biomarcatori di danno cromosomico è la determinazione dell'esposizione a radiazioni ionizzanti.

Il rischio associato alla potenziale esposizione a radiazioni ionizzanti è di grande attualità in considerazione dell'impiego di sostanze radioattive e di altre sorgenti di radiazioni nel campo dell'industria, della medicina e della ricerca e di eventi accidentali o ostili. In conseguenza di incidenti ed ancora più nell'ipotesi di atti di sabotaggio, quali azioni con finalità terroristiche, si possono verificare sovraesposizioni a radiazioni ionizzanti con possibili danni gravi per la salute degli esposti. Nello studio dell'esposizione acuta accidentale a radiazioni ionizzanti è molto importante avere una stima delle dosi ai fini diagnostici e prognostici e per poter pianificare i necessari interventi terapeutici. Il principale effetto indotto dalle radiazioni è costituito da un'alterazione della struttura e del numero dei cromosomi. Le aberrazioni cromosomiche instabili nei linfociti periferici, ed in particolare i dicentrici, rappresentano i biomarcatori più specifici ed al tempo stesso più utilizzati per l'esposizione a radiazioni ionizzanti. I test di valutazione diretta delle aberrazioni cromosomiche, anche con l'applicazione delle più recenti tecnologie, comportano l'analisi di un ampio numero di metafasi per ottenere un risultato statisticamente significativo e quindi prevedono tempi lunghi e l'impiego di personale altamente specializzato. Il test del micronucleo, come indice di danno cromosomico, rappresenta un mezzo indiretto di valutazione del danno cromosomico ed essendo di più semplice applicazione rispetto ai dicentrici, è stato proposto come potenziale biomarcatore per l'esposizione a radiazioni ionizzanti anche a basse dosi. Questo biomarcatore, applicato ai linfociti di sangue periferico ha dimostrato in diversi studi buona sensibilità, se pur minore specificità rispetto al test dei dicentrici. In parallelo all'analisi della frequenza di micronuclei, negli stessi preparati possono essere valutate anche altre alterazioni nucleari, quali la presenza di ponti nucleocitoplasmatici, indicatori della presenza di cromosomi dicentrici e ad anello, i bud come indice di presenza di double minutes. La determinazione di questi parametri può consentire di migliorare il potere predittivo del test del micronucleo come indice di rischio per l'esposizione a radiazioni. Anche la lettura di preparati per la valutazione di alte frequenze di micronuclei associate ad alte dosi di radiazioni ionizzanti comporta tempi lunghi e personale addestrato. L'elaborazione di criteri di scoring meno stringenti determinati per elevate frequenze consente di ridurre tempi mantenendo livelli di significatività accettabili. Tentativi di automatizzazione della lettura dei micronuclei hanno fornito risultati incoraggianti evidenziando correlazioni significative con le letture visuali.

Il test del micronucleo è considerato un biomarcatore appropriato per valutare esposizioni cumulative ed è stato ampiamente applicato nel biomonitoraggio di popolazioni esposte a pesticidi in agricoltura. Alcuni pesticidi, in particolare gli erbicidi, sono oggi utilizzati su larga scala anche mediante l'impiego di mezzi aerei per la distribuzione implicando in determinate situazioni non solo l'esposizione degli operatori, ma anche della popolazione generale.

Un esempio di questo è fornito dal glifosate, erbicida dotato di bassa tossicità, ma potenzialmente genotossico particolarmente applicato in specifiche formulazioni usate ad esempio per la maturazione della canna da zucchero.

E' importante quindi programmare studi di biomonitoraggio mirati a determinate esposizioni a pesticidi per evidenziare il potenziale rischio delle formulazioni non valutate in fase di registrazione per gli effetti a lungo termine.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

- Standardizzazione ed intercalibrazione della metodica del micronucleo applicata alle cellule esfoliate di mucosa orale nell'ambito del programma internazionale HUMN (The International Collaborative Project on Micronucleus Frequency in Human Populations).
- Definizione delle potenzialità di utilizzo del test del micronucleo per valutare esposizioni a radiazioni ionizzanti.
- Costruzione della curva di calibrazione per i cromosomi dicentrici e per la frequenza di micronuclei su linfociti periferici coltivati in vitro e trattati a differenti dosi di radiazioni ionizzanti.
- Automatizzazione della lettura dei micronuclei nei linfociti di sangue periferico.
- Applicazione dei biomarcatori di genotossicità, test del micronucleo e del Comet assay, nella valutazione dell'esposizione a composti o miscele di composti genotossici con particolare riferimento ai pesticidi utilizzati in agricoltura.

Impatto assistenziale certo o potenziale

La determinazione del danno cromosomico, attraverso la valutazione della frequenza di micronuclei, rappresenta un biomarcatore di effetto precoce che permette di definire a livello di popolazione l'esposizione ad agenti genotossici. La sua applicazione in associazione a marcatori di esposizione consente di attuare strategie di prevenzione primaria.

La stima delle dosi di esposizione a radiazioni ionizzanti, mediante l'utilizzo di biomarcatori di danno cromosomico è di grande utilità ai fini diagnostici e prognostici e per poter pianificare i necessari interventi terapeutici.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

A) Standardizzazione ed intercalibrazione della metodica del micronucleo applicata alle cellule esfoliate di mucosa orale nell'ambito del programma internazionale HUMN. Definizione della potenzialità del test per differenti modalità di esposizione a classi di composti genotossici.

B) Costruzione di curve di calibrazione per entrambi i biomarcatori di danno cromosomico associati all'esposizione a radiazioni ionizzanti (cromosomi dicentrici e frequenze di micronuclei) per differenti tipologie di radiazioni, al fine di definire i limiti inferiori di rilevamento, essendo le basse dosi attualmente più interessanti a livello di massività di esposizione.

Le curve di calibrazione vengono costruite con i dati di danno citogenetico ottenuti dal trattamento "in vitro" di linfociti da sangue periferico a differenti dosi di radiazioni ionizzanti. I campioni devono essere prelevati a individui sani, in numero sufficiente, differenziando per sesso e per età. Le valutazioni devono essere effettuate in cieco da uno stesso lettore su preparati microscopici ottenuti da due diverse culture di linfociti dello stesso soggetto.

C) Validazione della procedura di automatizzazione della lettura dei preparati, per la determinazione dei cromosomi dicentrici e della frequenza dei micronuclei in collaborazione con gli altri centri operanti a livello internazionale.

Programmazione 2009-2011

Attualmente le valutazioni possono essere effettuate con procedure semiautomatiche con un controllo finale della gallerie di immagini valutate dal sistema, pur con una drastica riduzione dei tempi di lettura.

Ulteriori esercizi consentiranno di migliorare e standardizzare i criteri di valutazione del sistema e di organizzare un'intercalibrazione a livello internazionale tra laboratori ai fini di una sua validazione. L'automatizzazione delle letture del micronucleo costituisce anche un importante progresso per l'applicazione del metodo in studi di monitoraggio di ampie dimensioni.

Verrà effettuata la determinazione del rischio, associato alla potenziale esposizione a radiazioni ed altri agenti genotossici, dei soldati italiani in teatro di guerra in Iraq nell'ambito di un progetto in fase di conclusione che prevedeva uno studio di biomonitoraggio con il test del micronucleo in una popolazione di circa 900 soggetti valutati prima e dopo la missione.

D) Studi di monitoraggio dell'esposizione a pesticidi in agricoltura. Un primo studio prevede la determinazione della potenziale genotossicità del glifosato e delle sue formulazioni più utilizzate. Verrà inizialmente considerata la tipologia di distribuzione con mezzo aereo.

Verranno successivamente considerate altre modalità di esposizione a miscele di composti, in particolare l'utilizzo dei pesticidi in serra.

Attività previste per il 2009

A) Standardizzazione del protocollo sperimentale per il test del micronucleo applicato alle cellule esfoliate di mucosa orale. Avvio di uno studio di intercalibrazione della metodica .

B) Costruzione di una curva di calibrazione per il test del micronucleo per la biodosimetria dell'esposizione a radiazioni ionizzanti. Analisi dei risultati relativi allo studio di biomonitoraggio condotto sui militari italiani in missione in Iraq.

C) Verrà completato uno studio di biomonitoraggio in 4 gruppi di soggetti con differente modalità di esposizione a glifosato ed una popolazione di controllo non esposta a pesticidi. E' stata considerata la modalità di utilizzo dell'erbicida per la distruzione dei campi di coca e per in fase di maturazione della canna da zucchero. I soggetti di controllo sono stati reclutati in una popolazione di coltivatori di caffè biologico senza l'utilizzo di pesticidi. Verrà valutata la frequenza di micronuclei nei linfociti di sangue periferico in tre diversi campionamenti: prima, durante e dopo l'esposizione all'erbicida glifosato.

Tra i risultati attesi 2009:

A) Protocollo sperimentale per la valutazione dei micronuclei nelle cellule esfoliate di mucosa orale.

B) Relazione conclusiva sul rischio potenziale associato all'esposizione ad agenti genotossici nel teatro di guerra in Iraq.

C) Determinazione del rischio genotossico associato all'esposizione a formulazioni contenenti glifosato nella modalità di distribuzione con mezzo aereo.

Track record

Bonassi S.-Znaor A.-Ceppi M.-Lando C.-Chang W.-Holland N.-Kirsch M.-Zeiger E.-Ban S.-Barale R.-Bigatti M.-Bolognesi C.-Cebulska A.-Fabianova E.-Fucic A.-Hagmar L.-Joksic G.-Martelli A.-Migliore L.-Mirkova E.-Scarfi MR.-Zijno A.-Norppa H.-Fenech M.

An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 28:625/631, 2007

Fenech M.-Bolognesi C.-Kirsch-Volders M.-Bonassi S.-Zeiger E.-Knasmuller S.-Holland N. Harmonisation of the micronucleus assay in human buccal cells—a Human Micronucleus (HUMN) project (www.humn.org) initiative commencing in 2007. *Mutagenesis* 22:3/4, 2007

Garte S.-Taioli E.-Popov T.-Bolognesi C.-Farmer P.-Merlo F. Genetic susceptibility to benzene toxicity in human. *J. Toxicol. Environ. Health* 71:1482/1489, 2008

Holland N.-Bolognesi C.-Kirsch M.-Bonassi S.-Geiger E.-Knasmuller S.-Fenech M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat. Res. Rev. Mutat.* 659:93/108, 2008

Pala M.-Ugolini D.-Ceppi M.-Rizzo F.-Maiorana L.-Bolognesi C.-Schilirò T.-Gilli G.-Bigatti P.-Bono R.-Vecchio D. Occupational exposure to formaldehyde and biological monitoring of Research Institute workers. *Cancer Detect. Prev.* 32:121/126, 2008

Pavanello S.-Kapka L.-Siwinska E.-Mielzynska D.-Bolognesi C.-Clonfero E. Micronuclei related to anti-B[a]PDE/DNA adduct in peripheral blood lymphocytes of heavily polycyclic aromatic hydrocarbon exposed nonsmoking coke oven workers and controls. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17:2795/2799, 2008

Bonassi S.-Biasotti B.-Kirsch-Volders M.-Knasmuller S.-Zeiger E.-Burgaz S.-Bolognesi C.-Holland N.-Thomas P.-Fenech M. State of art of the buccal micronucleus assay- a first stage in the HUMNXL project initiative. *Mutagenesis* Epub May 28, 2009

Ravanello S.-Bollati V.-Pesatori AC.-Kapka L.-Bolognesi C.-Bertazzi PA.-Baccarelli A. Global and gene-specific promoter methylation changes are related to anti-B(a)PDE-DNA adduct levels and influence micronuclei levels in polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed individuals.

Programmazione 2009-2011

Int. J. Cancer Epub Apr 7, 2009

Thomas P.-Holland N.-Bolognesi C.-Kirsch-Volders M.-Bonassi.-Zeiger E.-Knasmuller S.-Fenech M.
Buccal cytome assay.
Nature Prot. 4(6): 825/837, 2009

Suscettibilità ai mutageni: biomarcatori di genotossicità come indicatori di rischio di cancro

Linea di ricerca: 1 - Prevenzione e Cancerogenesi

Programma: b - Biomarcatori biologici e molecolari di esposizione, di danno, di suscettibilità e di rischio di cancro

Responsabile scientifico: Claudia Bolognesi

Altro personale della struttura partecipante al progetto: Paola Roggieri, Andrea Sciutto

Anno di inizio: 2009

Durata: 36 mesi

Parole chiave: biomarcatori; test del micronucleo; Comet assay; danno cromosomico; suscettibilità; Mutagen Sensitivity Assay- MSA

Altre strutture IST partecipanti: S.C. Epidemiologia Clinica (P. Bruzzi); S.S. Centro Tumori Ereditari (L. Varesco); S.S. Epidemiologia Molecolare (S. Bonassi); S.C. Epidemiologia e Biostatistica (D.F. Merlo)

Tipologia progetto: preclinica

Area di interesse: prevenzione primaria/secondaria

Soggetti cofinanziatori: Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro

Background

La frequenza di micronuclei (MN) nei linfociti di sangue periferico ha dimostrato di rappresentare un biomarcatore di instabilità genetica, come è stato osservato per differenti tipi di neoplasie. Incrementi significativi nella frequenza di micronuclei nei linfociti di sangue periferico sono stati osservati in gruppi di pazienti con tumori, particolarmente in forme legate a suscettibilità individuale, quali ad esempio il mesotelioma pleurico ed il tumore alla mammella.

E' noto che l'esposizione pregressa ad asbesto per via inalatoria induce un danno permanente a livello polmonare causato dalla presenza delle fibre di piccole dimensioni negli alveoli.

E' stato ipotizzato che l'induzione di danno genotossico mediato da un effetto ossidativo possa essere la causa dell'induzione di tumori nei soggetti maggiormente suscettibili.

Il danno genetico rilevato in un tessuto surrogato quale i linfociti di sangue periferico è correlato a quello rilevabile a livello degli organi bersaglio. Un incremento di micronuclei, se pur non statisticamente significativa, è stato osservato negli esposti ad asbesto rispetto ai non esposti.

Studi ex-vivo in pazienti con mesotelioma indotto dall'esposizione ad asbesto hanno dimostrato una frequenza più elevata di micronuclei nei linfociti periferici, riferibile anche alla differente suscettibilità.

E' stata dimostrata un'ampia variabilità interindividuale nella capacità di riparazione del DNA che si traduce in una variabilità nella suscettibilità agli insulti genotossici e quindi al cancro. Generalmente i pazienti con differenti tipi di neoplasie presentano instabilità genomica associata ad alterazioni dei meccanismi di riparo del DNA.

Una determinazione indiretta della suscettibilità individuale agli agenti mutageni è ottenuta mediante la misura di eventi genotossici, quali rotture sulla singola o doppia elica del DNA, aberrazioni cromosomiche, micronuclei nei linfociti da sangue periferico trattati in vitro con agenti genotossici. Sono stati pubblicati ad oggi almeno 100 studi retrospettivi che dimostrano correlazioni significative tra la sensibilità ai mutageni e l'insorgenza di tumori. Studi famigliari hanno dimostrato che i parenti di primo grado di soggetti suscettibili mostrano simili livelli di sensibilità, indicando una predisposizione genetica alla suscettibilità ai mutageni. Gli studi sui gemelli rappresentano l'evidenza più importante che la sensibilità ai mutageni è ereditabile e quindi rappresenta un fattore importante di suscettibilità al cancro.

Il challenge in vitro attuato con agenti specifici porta quindi ad una amplificazione delle differenze nella frequenza basale di danno genotossico tra il gruppo dei pazienti ed un analogo gruppo di controlli sani. La valutazione della sensibilità agli agenti mutageni si può oggi considerare un indice rilevante di rischio per l'insorgenza di tumori.

Il test di sensibilità ai mutageni (Mutagen Sensitivity Assay MSA) consiste nella valutazione degli effetti genotossici indotti nei linfociti di sangue periferico dal trattamento con agenti chimici o fisici. Le radiazioni ionizzanti e i composti chimici radiomimetici si sono dimostrate come gli agenti sensibilizzanti più efficaci, essendo in grado di indurre differenti tipi di danno sulla molecola del DNA e reclutando quindi differenti sistemi di riparazione. Il test del micronucleo, rappresentando l'espressione di un ampio numero di eventi genetici, si è dimostrato tra i più sensibili nella rilevazione della sensibilità ai mutageni.

Il test di sensibilità ai mutageni potrebbe essere utilizzato per valutare una differente suscettibilità in pazienti con esposizioni pregresse ad asbesto ed eventualmente anche di determinare il ruolo di trattamenti di chemioprevenzione nel diminuire l'effetto genotossico del trattamento con diversi challenge, con particolare riferimento agli agenti ossidanti.

Programmazione 2009-2011

Studi di piccole dimensioni hanno rilevato nei pazienti con tumore ereditario associato a mutazioni BRCA1 e BRCA2 una elevata sensibilità alle radiazioni, determinata come incremento della frequenza di micronuclei dopo challenge in vitro con radiazioni ionizzanti o con composti radiomimetici. Altri studi dimostrano una maggiore sensibilità ai mutageni in pazienti con predisposizione familiare al tumore alla mammella non direttamente associati alle mutazioni nei geni BRCA. E' importante quindi allo stato attuale valutare la potenzialità del test del micronucleo nella valutazione della sensibilità in vitro ai mutageni ai fini di un suo potenziale utilizzo come test di prescreening nei soggetti a rischio per il tumore alla mammella.

Obiettivo generale del progetto ed eventuali obiettivi secondari

- Valutazione della correlazione tra effetti genotossici indotti in vitro (test di sensibilità ai mutageni) e suscettibilità individuale quale fattore di rischio oncogeno.
- Valutazione della sensibilità e della predittività del test del micronucleo nel monitoraggio di pazienti con mesotelioma pleurico e loro familiari comparati a soggetti sani ed a soggetti con affezioni polmonari benigne, esposti o no ad asbesto. ai fini di rilevare la suscettibilità individuale per questa neoplasia in associazione o no all'esposizione professionale pregressa ad asbesto.
- Valutazione del potenziale valore predittivo del test del micronucleo nel rilevare predisposizioni genetiche per il tumore alla mammella, quali ad esempio la mutazione di geni ad alta penetranza BRCA1 e BRCA2.

Impatto assistenziale certo o potenziale

Potenzialità di utilizzo di test di sensibilità ai mutageni come prescreening nei pazienti a rischio per il tumore alla mammella.

Attività programmate 2009-2011 e risultati attesi

A) Verrà completata la raccolta di campioni di sangue periferico da pazienti con mesotelioma pleurico tumore polmonare, soggetti a rischio per le malattie polmonari e controlli sani. Verrà completata l'analisi dei campioni di linfociti di sangue periferico dai diversi gruppi di pazienti, che sono stati processati per la valutazione della frequenza di micronuclei in condizioni basali e dopo challenge con due dosi di radiazioni ionizzanti e con bleomicina.

Verrà valutata la differente attività genotossica indotta da challenge con radiazioni ionizzanti e agenti ossidanti, per trattamento in vitro dei linfociti di sangue periferico prelevati da un gruppo di soggetti con pregressa esposizione ad asbesto ed un analogo gruppo di controllo. L'attività genotossica sarà determinata con un test di danno al DNA: il Comet assay con opportune modifiche per la valutazione del danno ossidativo. Il danno cromosomico, in termini di frequenza di micronuclei, sarà valutato nei linfociti trattati con radiazioni ionizzanti ad alte dosi. Verrà quindi determinata l'attività protettiva della NAC per i differenti tipi di trattamento nei due gruppi.

B) Lo studio relativo al valore predittivo del test di sensibilità ai mutageni per il tumore alla mammella prevede il reclutamento nell'ambito dell'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro di Genova di pazienti con tumore alla mammella, soggetti a rischio ed un campione rappresentativo della popolazione generale per la determinazione delle frequenze di micronuclei nei linfociti di sangue periferico coltivati in vitro in presenza ed assenza di trattamento con agenti genotossici.

In una fase preliminare dello studio verranno considerati diversi agenti genotossici: radiazioni ionizzanti, bleomicina, perossido di idrogeno a diversi dosaggi, per definire il protocollo sperimentale più efficace. Scopo del progetto è verificare eventuali differenze delle frequenze di micronuclei basali e/o indotte per la presenza di mutazioni patogenetiche o no ai geni BRCA1 e BRCA2, o di altri fattori di rischio in pazienti con tumore e soggetti sani.

Attività previste nel 2009

A) Completamento della determinazione della frequenza di base dei micronuclei in gruppi di soggetti con mesotelioma, tumore polmonare, soggetti a rischio per le malattie polmonari e controlli sani reclutati negli scorsi anni. Valutazione statistica dei risultati in associazione all'esposizione ad asbesto.

Valutazione dell'attività protettiva della NAC (a differenti dosaggi) per il danno indotto da radiazioni e da differenti concentrazioni di composti chimici con attività ossidante (bromato di potassio e bicromato di potassio). Verranno considerate differenti condizioni sperimentali di trattamento in presenza ed assenza di NAC con la determinazione del danno al DNA e del danno ossidativo valutato in presenza di enzimi specifici (FPG a ENDO III).

Verranno raccolti campioni di sangue periferico da 10 soggetti con pregressa esposizione ad asbesto e da 10 controlli. Saranno preparate le culture che verranno quindi trattate alle condizioni sperimentali stabilite nell'esperimento preliminare.

B) Verrà condotto uno studio di metanalisi che prenderà in considerazione tutti gli studi disponibili in pazienti a rischio per il tumore della mammella, relativi alla determinazione della sensibilità alle radiazioni rivelate per trattamento in vitro dei linfociti di sangue periferico mediante la valutazione della frequenza di micronuclei

Saranno reclutati gruppi di soggetti a rischio per il tumore della mammella che hanno dato il loro consenso per il test genetico ed un gruppo di controllo. Saranno valutate le frequenze basali di micronuclei nei linfociti di sangue periferico. Verrà effettuato il test in vitro di sensibilità ai mutageni utilizzando diversi agenti sensibilizzanti ed a diverse dosi, quali radiazioni ionizzanti, bleomicina ed acqua ossigenata per evidenziare quello che permetta una maggior discriminazione tra soggetti sensibili e no.

Risultati attesi per il 2009:

A) Valutazione dei risultati relativi alla frequenza di micronuclei nei soggetti con mesotelioma, tumore polmonare, soggetti a rischio per le malattie polmonari e controlli sani.

Definizione del protocollo sperimentale per la valutazione dell'attività protettiva della NAC per il danno indotto da agenti ossidanti in pazienti con pregressa esposizione ad asbesto.

B) Determinazione del differente potere discriminatorio degli agenti genotossici utilizzati come challenge in vitro nel test di sensibilità ai mutageni su soggetti a rischio per il tumore alla mammella.

Programmazione 2009-2011

Track record

Bolognesi C.-Martini F.-Tognon M.-Filiberti R.-Neri M.-Perrone E.-Landini E.-Canessa P.A.-Ivaldi G.P.-Betta P.-Mutti L.-Puntoni R.

A molecular epidemiology case control study on pleural malignant mesothelioma.
Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 14(7):1741/1746, 2005

Garte S.-Taioli E. Popov T.-Bolognesi C.-Farmer P. Merlo F.

Genetic susceptibility to benzene toxicity in human.
J. Toxicol. Environ. Health 71:1482/1489, 2008

Saccà S.-Bolognesi C.-Battistella A.-Izzotti A.

Gene-environment interaction in ocular diseases.
Mutat. Res. 667:98/117, 2008