

## 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, biostatistica e clinical trials (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

## Consuntivo 2010 - Programmazione 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.

### *Risultati e prodotti 2010*

A. Nel corso del 2010 sono stati condotti 2 campionamenti, nel periodo tardo-primaverile ed invernale, in due aree nel sito di bonifica di interesse nazionale Cogoleto-Stoppani attraverso l'applicazione di una batteria di biomarcatori di genotossicità (danno al DNA e frequenza di micronuclei) ed di danno ossidativo (catalasi, superossido dismutasi, glutazione per ossidasi e perossidazione lipidica) in mitili stabulati per un periodo di 28 giorni. Nel campionamento tardo-primaverile si osservano incrementi significativi, rispetto al sito di controllo, per tutti i parametri ad eccezione della superossido dismutasi. Le analisi relative al campionamento invernale sono tuttora in corso.

B. E' stato completato il programma di monitoraggio nell'area del relitto della petroliera Haven. Sono stati condotti complessivamente 5 campionamenti a partire dal periodo immediatamente successivo all'incidente fino al momento della prospezione e della bonifica (2003-2010). Ostriche, stanziali e stabulate in cinque stazioni sul relitto e pesci stanziali (*Mullus barbatus*) prelevati nell'area del relitto sono stati utilizzati come bioindicatori. 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. Una valutazione complessiva dei risultati ottenuti nelle diverse campagne, permette, di osservare effetti genotossici più elevati negli animali stanziali rispetto a quelli stabulati e nelle campagne condotte dopo la prospezione e durante la bonifica.

C. In merito alla caratterizzazione del profilo tossicologico della tossina prodotta da *Ostreopsis ovata* sono stati testati alcuni estratti da tessuti di mitili o da ricci di mare contaminati o no dalla tossina, risultati positivi o negativi con il mouse test. Gli estratti positivi, a differenza di quelli negativi, hanno dimostrato sulla linea cellulare HepG2 di epatoma umano riduzione della vitalità cellulare (IC50 05-1 ng), incremento dose- risposta di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e del danno al DNA, valutato con il comet assay. Una valutazione parallela degli estratti nelle cellule RTG2, linea stabilizzata da gonadi di pesci, ha dimostrato una minore tossicità, suggerendo la possibilità di un accumulo della tossina attraverso la catena alimentare.

D. E' stato standardizzato il protocollo sperimentale per la determinazione della frequenza di micronuclei, come indice di danno cromosomico, sui celomociti di *Eisena foetida*, verme del terreno considerato come potenziale bioindicatore per la sua presenza ubiquitaria ed il suo ruolo ecologico nelle biocenosi del suolo. Studi di validazione sono stati condotti per trattamento con benzo(a)pirene e diossina inquinanti di riferimento per il suolo, a concentrazioni rilevanti a livello ambientale.

### *Pubblicazioni*

Bolognesi C.-Hayashi M.  
Micronucleus assay in aquatic animals.  
Mutagenesis, in press

### *Presentazioni a congressi*

Bolognesi C.  
The micronucleus test as a biomarker of genomic damage: the validation process in environmental animals.  
27th Congress of the European Society of Comparative Biochemistry and Physiology. Alessandria Sept 5-9, 2010

Bolognesi C.  
The micronucleus assay in mussels: theoretical and laboratory activity.  
WHO Med Pol Training course" Alessandria 13-15 Settembre 2010

Sforzini S.-Saggese I.-Oliveri L.-Viarengo A.-Bolognesi C.  
Use of the Comet ans micronucleus assays for in vivo genotoxicity assessment in the coelomocytes of the earthworm *Eisena Andrei*.  
27th Congress of the European Society of Comparative Biochemistry and Physiology. Alessandria Sept 5-9, 2010

Bolognesi C.-Sciutto A.-Roggieri P.  
Genotoxicity biomarkers in monitoring aquatic environment: in situ case-studies along the Italian coasts.  
International Symposium on Alternate Animal Models in Biological Research: Present and Future Perspectives in Toxicology, Lucknow, India October 29-31, 2010. ATLA, in press

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

A. Nel corso del 2011 verranno completate le analisi relative al campionamento invernale 2010 condotto in due aree nel sito di bonifica di interesse nazionale Cogoleto-Stoppani. Verrà effettuata un'analisi dei dati ottenuti, nei campionamenti condotti dal 2007 ad oggi, con i diversi biomarcatori di genotossicità, in correlazione alle concentrazioni di Cr III e CrVI rilevate nell'acqua e nei tessuti degli animali, per determinarne il loro valore predittivo, ai fini della programmazione di future campagne di monitoraggio durante le operazioni di bonifica.

B. Nell'ambito del progetto pilota attuato nell'area del relitto della petroliera Haven, al largo di Arenzano, verrà effettuata una analisi complessiva di tutti i risultati, relativi ai biomarcatori di genotossicità ottenuti nel tempo in mitili, ostriche e pesci, in correlazione con i dati relativi alla bioconcentrazione degli inquinanti nei tessuti degli animali.

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Questa analisi ha lo scopo di definire il ruolo dei tre bioindicatori utilizzati, prelevati a differenti profondità e rappresentativi dei diversi habitat e livelli della catena alimentare, in un approccio integrato di valutazione del danno ambientale durante la bonifica di un sito contaminato.

C. Verranno condotti esperimenti in vitro utilizzando estratti ottenuti da tessuti di mitili e ricci per la determinazione della tossicità e potenziale genotossicità della tossina prodotta da *Ostreopsis ovata*, attraverso l'analisi dei componenti principali della risposta adattativa al danno ossidativo, quali gli enzimi antiossidanti catalasi, superossido dismutasi e glutatione perossidasi, della perossidazione lipidica, e la valutazione del danno al DNA e danno cromosomico.

D. Verranno condotti ulteriori studi di validazione del test del micronucleo nei celomociti di *Eisenia foetida*, mediante il trattamento in condizioni controllate con inquinanti rilevanti per il suolo, quali metalli pesanti e pesticidi, ai fini di determinare la sensibilità e specificità del test per una sua applicazione in studi di monitoraggio.

### **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:* HUMN HUMAN MicroNucleus The International Collaborative Project on Micronucleus Frequency in Human Populations, Unità di Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Padova

*Tipologia progetto:* preclinica

*Area di interesse:* prevenzione primaria/secondaria

*Soggetti cofinanziatori:* Ministero della Difesa; 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 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

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

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 ai 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 glifosato, erbicida dotato di bassa tossicità, ma potenzialmente genotossico particolarmente applicato in specifiche formulazioni usate ad esempio per la maturazione della canna da zucchero.

È 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.

### *Risultati e prodotti 2010*

A) Nell'ambito dello progetto internazionale HUMN sulla applicazione del test del micronucleo in studi di biomonitoraggio nell'uomo, è stato standardizzato il protocollo di applicazione del test nelle cellule esfoliate di mucosa orale. Sono stati definiti i criteri di scoring del micronucleo e delle altre alterazioni nucleari rilevanti attraverso un esercizio di intercalibrazione con l'Istituto di Ricerca sul Cancro dell'Università di Vienna. Sono stati raccolti a Genova campioni di cellule di mucosa orale da 10 pazienti sottoposti a radioterapia e da un analogo gruppo di controllo, ed in parallelo a Vienna da un gruppo di soggetti con sindrome di Down e controlli, al fine di preparare set di vetrini con cellule caratterizzate da diversi livelli di frequenza di micronuclei per lo studio internazionale di intercalibrazione.

B) È stato completato lo studio di impatto genotossico nelle unità militari (Progetto SIGNUM finanziato dal Ministero della Difesa) condotto su 900 soldati italiani in missione in Iraq.

Il danno genotossico, in termini di frequenza di micronuclei è stata valutata nei linfociti di sangue periferico dei soggetti alla partenza ed al rientro dalla missione

Il confronto delle frequenze di cellule micronucleate osservate nella popolazione esaminata prima e dopo la missione in teatro operativo ha rivelato un aumento significativo pari al 18%, anche se i livelli medi delle frequenze di cellule micronucleate nella popolazione in studio sono compresi nell'intervallo dei valori riportati per popolazioni non esposte di pari età e sesso. Differenze maggiori sono state osservate nei gruppi che svolgevano prevalentemente attività esterna od attività specifiche (conduttori, pattugliatori), tuttavia non caratterizzati dall'esposizione a specifici agenti xenobiotici.

C) È stata condotta una revisione dei dati di letteratura relativi all'applicazione del test del micronucleo nell'esposizione a pesticidi con particolare riferimento alle coltivazioni in serra.

### *Pubblicazioni*

Bolognesi C.-Balìa C.-Roggieri P.-Cardinale F.-Bruzzi P.-Sorcinelli F.-Lista F.-D'Amelio R.-Righi E.  
Micronucleus test for radiation biodosimetry in mass casualty events: Evaluation of visual and automated scoring.  
Radiat. Measur., in press

Bolognesi C.-Creus A.-Ostrosky-Wegman P.-Marcos R.  
Micronuclei and pesticide exposure.  
Mutagenesis, in press

# Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

Fenech M.-Holland N.-Zeiger E.-Chang W.P.-Burgaz S.-Thomas P.-Bolognesi C.-Knasmueller S.-Kirsch-Volders M.-Bonassi S.

The HUMAN and HUMNxL International collaboration projects on human micronucleus assay in lymphocytes and buccal cells: past, present and future.

Mutagenesis, in press

## *Presentazioni a congressi*

Bolognesi C.

Il test del micronucleo nel monitoraggio di popolazioni a rischio.

24° Corso Avanzato di Radioprotezione Medica, Bressanone, 30 agosto-3 settembre 2010

Bolognesi C.

Impact of genotoxicity in risk assessment of pesticides, their metabolites and degradates. New Pesticide Regulation: Innovative Aspects and Emerging Problems.

Joint Meeting SIMA-SITOX, Roma, 5 ottobre 2010

## *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

A) Nell'ambito dello studio di intercalibrazione del test del micronucleo nelle cellule esfoliate di mucosa orale verrà organizzata la preparazione di differenti set di vetrini dai campioni raccolti da pazienti sottoposti a radioterapia e da soggetti con sindrome di Down e relativi controlli. Verrà effettuata un'analisi dei vetrini in parallelo nei due laboratori responsabili dello studio di intercalibrazione (s.s. Cancerogenesi ambientale - IST Genova e Istituto per la Ricerca sul Cancro, Univ. Vienna) con la raccolta di immagini relative alle diverse alterazioni nucleari rilevanti nelle cellule esfoliate di mucosa orale. Un set di vetrini con cellule caratterizzate da diverse frequenze di micronuclei e da specifiche alterazioni nucleari verranno distribuiti a 18 laboratori selezionati per lo studio di intercalibrazione.

B) Verrà condotta un'analisi dei dati relativi allo studio di biomonitoraggio genotossico nelle unità militari per identificare specifici fattori di esposizione associabili alla missione in teatro operativo ai fini di attuare interventi preventivi.

C) Nell'ambito della valutazione del rischio a lungo termine associato all'esposizione a pesticidi sarà valutata la potenziale genotossicità del glifosate, considerando diverse modalità di esposizione.

## **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 Sciotto

*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.c. Epidemiologia, biostatistica e clinical trials (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.

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

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.

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 famigliare 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.

### *Risultati e prodotti 2010*

A) E' stata completata l'analisi della frequenza di micronuclei nei linfociti di sangue periferico da pazienti con mesotelioma pleurico, tumore polmonare, soggetti a rischio per le malattie polmonari e controlli sani. E' in corso di preparazione il database, comprendente complessivamente 605 soggetti al fine di avviare l'analisi statistica dei risultati.

La sensibilità ai mutageni associata a pregressa esposizione ad asbesto è stata determinata in un gruppo di 10 soggetti in comparazione con un analogo gruppo di controlli, mediante valutazione del danno al DNA con il test della Cometa e del danno cromosomico, in termini di frequenza di micronuclei, nei linfociti di sangue periferico dopo trattamento in vitro con radiazioni ionizzanti e con un agente ossidante (bicromato di potassio). Risultati preliminari indicano, nei soggetti esposti ad asbesto, una maggiore suscettibilità con ampia variabilità interindividuale, al danno genotossico, espressa in termini di basi ossidate e diminuita capacità di riparo del DNA,

B) Nell'ambito del progetto di valutazione del potenziale predittivo del test del micronucleo nel rilevare predisposizioni genetiche per il tumore alla mammella, sono stati reclutati ad oggi 390 soggetti, comprendenti individui a rischio per il tumore della mammella che hanno dato il loro consenso per il test genetico ed un gruppo di controllo. E' stato effettuato il test in vitro di sensibilità ai mutageni associato alla determinazione della frequenza di micronuclei, utilizzando challenge con radiazioni ionizzanti alle dosi di 1 e 2 Gy. E' attualmente in corso la valutazione della frequenza dei micronuclei nei campioni raccolti.

E' stata avviata una revisione sistematica e meta-analisi della letteratura scientifica relativa all'applicazione del test del micronucleo nella valutazione della sensibilità a radiazioni in pazienti con tumore alla mammella o con predisposizione familiare o genetica al tumore alla mammella ai fini di definire il ruolo del test nella identificazione di soggetti a rischio.

### *Pubblicazioni*

Bonassi S.-El-Zein R.-Bolognesi C.-Fenech M.

Micronucleus frequency in peripheral lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies.

Mutagenesis, in press

## Consuntivo 2010 - Programmazione 2011

### *Attività previste e risultati attesi nel 2011*

A) Verrà effettuata la valutazione dei dati della frequenza di micronuclei in linfociti di sangue periferico da pazienti con mesotelioma pleurico, tumore polmonare, soggetti a rischio per le malattie polmonari ai fini della valutazione del potenziale ruolo del test nell'individuazione dei soggetti a rischio.

Saranno completate le analisi relative alla suscettibilità ai mutageni, mediante la valutazione del danno al DNA e del danno cromosomico, nei soggetti con pregressa esposizione ad asbesto, in correlazione ai dati di espressione genica, determinata con la tecnica dei microarray, per i diversi tipi di trattamento e dei polimorfismi genetici relativi alla capacità metabolica e di riparazione del danno al DNA dei soggetti analizzati. Verrà altresì valutata l'attività protettiva della NAC per i differenti tipi di trattamento nei soggetti suscettibili e nei controlli.

B) Si continuerà il reclutamento di soggetti a rischio per il tumore della mammella per la determinazione della frequenza di micronuclei nei linfociti di sangue periferico prima e dopo il trattamento in vitro con radiazioni ionizzanti. In sottogruppi di campioni raccolti da pazienti, caratterizzati per la storia familiare e per la presenza di mutazioni nei geni BRCA1/BRCA2, verrà determinata la sensibilità ai mutageni anche mediante la valutazione del danno al DNA, usando il Comet assay, in termini di rotture sulla singola e doppia elica, danno ossidativo, cinetica di riparo a vari tempi dal trattamento (da 30 min a 2 h) in vitro con radiazioni ionizzanti a diverse dosi (da 1 a 4 Gy) e con agenti ossidanti (perossido di idrogeno, bicromato di potassio). Verranno definiti i fattori confondenti nell'applicazione in clinica dei biomarcatori di genotossicità considerati, quali la frequenza di micronuclei e il danno al DNA, valutato con il comet assay.