

## PROPOSTA PROGETTUALE

### ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA PER LA SORVEGLIANZA DI LAVORATRICI ESPOSTE A LAVORO NOTTURNO COME FATTORIE DI RISCHIO PER TUMORE MAMMARIO

**DURATA DEL PROGETTO:** ...24 mesi

### DESCRIZIONE DEL PROGETTO

#### *BASI RAZIONALI*

Il tumore mammario è la prima causa di mortalità per tumore delle donne (il 22 per cento di tutti i decessi oncologici). Si tratta di una patologia molto grave se non individuata e curata per tempo: Il tumore della mammella rappresenta in Italia una neoplasia di rilevante incidenza nella popolazione generale (14%) collocandosi al primo posto tra i tumori più frequentemente diagnosticati nelle donne. In Italia si registrano 40 mila nuovi casi, con un incremento di circa il 2% ogni anno (in larga parte associato dell'invecchiamento della popolazione) [<http://www.registri-tumori.it/cms/it/node/4572>].

La malattia, dovuta alla moltiplicazione incontrollata di alcune cellule della ghiandola mammaria che si trasformano in cellule maligne, spesso è asintomatica, va quindi diagnosticata precocemente. Il tumore mammario colpisce in media almeno una donna su dieci nell'arco della vita, ma esistono diversi fattori che portano all'aumento di questo valore medio specialmente in donne ad elevato rischio. Fra i fattori di rischio riconosciuti ritroviamo: la familiarità, la predisposizione genetica, l'uso eccessivo di estrogeni, la prima gravidanza in età adulta, lo stile di vita (valenza negativa hanno l'obesità, il fumo, la mancanza di attività fisica) [1]. Diverse evidenze scientifiche, però, mostrano che è oggi possibile annoverare anche le attività lavorative e le esposizioni professionali come ulteriori fattori di rischio per l'insorgenza del tumore del seno [1]. Nel 2007 l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha designato il lavoro a turni che comporta l'interruzione del ritmo circadiano come probabilmente cancerogeno [2]. Diversi studi hanno esaminato il rapporto tra lavoro a turni notturno ed il tumore mammario, con stime di elevazione di rischio che vanno dal 14 al 109% nei cosiddetti "rotating shift workers" (lavoratori che ruotano su turni) comprendenti anche la fascia notturna [3-6]. Purtroppo, la maggior parte di questi studi epidemiologici si riferisce al lavoro notturno senza una valutazione reale del livello di rischio associato alla durata e alla frequenza delle turnazioni. Mancano, inoltre, stime di rischio in relazione alla durata dell'esposizione

alla luce tracciabile con indicatori biologici. D'altra parte, dati ottenuti da uno studio recente di meta-analisi suggeriscono l'esistenza di una forte correlazione tra esposizione a turni lavorativi notturni e tumore mammario con un incremento della percentuale di rischio che aumenta da 1,19 a 4,73 a seconda della durata dell'esposizione occupazionale [6].

E' ormai opinione comune che la diagnosi precoce del tumore mammario sia un elemento indispensabile per superare le limitazioni degli studi epidemiologici e migliorare le possibilità terapeutiche e "outcome". L'attuale metodo di screening utilizzato per la diagnosi precoce è l'indagine eco-mammografica. Purtroppo, anche se molto efficace, questo approccio presenta numerose limitazioni. Pertanto, sarebbe necessario sviluppare metodi di prevenzione e di sorveglianza epidemiologica più sensibili, convenienti ed oggettivi che permettano di individuare fra le lavoratrici esposte a lavoro notturno quelle con una maggiore suscettibilità al tumore mammario. La biopsia liquida che valuta i profili di espressione genica delle cellule tumorali circolanti, spesso associate con la componente delle cellule mononucleate del sangue, è recentemente emersa come una tecnica potente per i casi di tumore metastatico.

## *OBIETTIVI*

### *Obiettivo generale*

Lo scopo principale di questo progetto sarà quello di individuare la possibile correlazione tra lavoro a turni, e modificazioni geniche/trascrittomiche in geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi del tumore mammario, al fine di fornire metodi utili alla sorveglianza epidemiologica e alla prevenzione del tumore mammario in operatrici esposte a lavoro a turni.

### *Obiettivi specifici*

Lo studio sarà finalizzato al raggiungimento dei seguenti obiettivi:

Obiettivo 1) STUDIO CASO-CONTROLLO: Ovvero, individuare possibili differenze nei profili di espressione genica (i geni sono specificati nella sezione metodi) in lavoratrici soggette a turnazione (CASI, 35-40) rispetto a lavoratrici non esposte a tale fattore di rischio per il tumore mammario (CONTROLLI, 40-50). A tale scopo le lavoratrici reclutate per lo studio verranno sottoposte all'analisi di espressione genica (trascrittomica) di geni potenzialmente correlati alla genesi del tumore mammario e di alcuni geni che controllano

il ritmo circadiano. Il numero ed il tipo delle modificazioni osservate verranno poi analizzate in funzione della durata e della frequenza di esposizione al lavoro a turni notturno ed in relazione al carico di lavoro monitorato tramite questionario.

Obiettivo 2) VALIDAZIONE: Ovvero, verificare quali tra i geni associati al lavoro notturno possono rappresentare reali biomarcatori di rischio per tumore mammario in due popolazioni indipendenti. Una popolazione sarà costituita da casi di affetti da tumore mammario neo-diagnosticato ma con nessuna storia pregressa di esperienza di lavoro notturno (30-40 soggetti); mentre l'altra popolazione sarà costituita da lavoratrici soggette a turnazione notturna e con diagnosi di tumore mammario recente o pregressa (30-40 soggetti).

#### *MATERIALI E METODI:*

- *Questionario*

Per questo studio verrà creato un Questionario ad hoc per raccolta dati anamnestici, antropometrici, stili di vita e familiarità per tumore mammario.

- *Raccolta dei campioni biologici ed isolamento dei PBMC*

I PBMC dei soggetti reclutati per lo studio verranno isolati da 10 cc di sangue periferico eparinato mediante stratificazione su gradiente di Lympholyte H (Cedarlane). Il plasma verrà separato dalla componente corpuscolata mediante centrifugazione dei campioni di sangue periferico. I PBMC ed il plasma isolati e crio-preservarli a -80°C fino al momento del loro uso.

- *Estrazione dell'RNA*

L'estrazione dell'RNA totale verrà effettuata utilizzando il reagente Trizol (Invitrogen) secondo il protocollo suggerito dalla casa produttrice.

- *Profili di espressione genica mediante tecnologia Real-Time PCR Open Array*

L'RNA totale sarà retro-trascritto in cDNA. Il cDNA sarà diluito con il TaqMan OpenArray Real-Time PCR Master Mix, caricato su un Chip custom da 48 campioni che analizza 56 diverse sonde TaqMan di espressione genica. Per l'analisi verrà utilizzata la piattaforma AccuFill e le reazioni di PCR saranno eseguite in un 12K Flex Real-Time PCR QuantStudio (Thermo Fisher Scientific). Questa piattaforma consente di misurare 34 geni strettamente correlati al tumore mammario

[<http://www.itb.cnr.it/breastcancer/index.html>], 16 geni che giocano un ruolo chiave nella regolazione del ritmo circadiano e correlati con il tumore mammario [9,10], e 6 geni di controllo. I dati grezzi saranno analizzati utilizzando un servizio in Cloud che converte i valori di CT per quantità relativa (RQ) utilizzando una trasformazione  $\Delta$ -D ed il programma R per le analisi statistiche. I valori di RQ dei geni bersaglio saranno normalizzati contro geni di controllo, e i cambiamenti di espressione saranno valutati in base ai rispettivi controlli. I valori minimo e massimo di RQ saranno calcolati con un livello di confidenza del 95%, utilizzando il test Benjamini-Hochberg per il controllo dei falsi positivi e regolare i valori di significatività (P). Il test t di Student verrà utilizzato per valutare il valore di P che verrà sarà statisticamente significativo se  $<0,05$ .

- *Analisi statistica*

Sia nel caso dell'obiettivo 1 che nel caso dell'obiettivo 2 l'analisi statistica verrà effettuata con analisi in uni e multi-variata per evidenziare i geni significativamente correlati con il lavoro in funzione del periodo di esposizione ed in funzione della presenza o meno di tumore mammario.

#### *TEMPI DI REALIZZAZIONE*

Il progetto verrà realizzato in 24 mesi con una programmazione tipo:

1. dal mese 1 al mese 18, verranno impiegati per la raccolta dei campioni e la raccolta dati della casistica sia per l'obiettivo 1 che 2. La casistica proverrà sia dalla sezione LILT di Latina che dagli Enti Partner 1 e 2.
2. dal mese 2 al mese 20, verranno impiegati per l'analisi dei campioni raccolti. Questo tipo di analisi verrà effettuata presso l'ente Partner 1 e coordinata dalla Dr. Anna Alisi.
3. dal mese 13 al mese 16, e dal mese 20 al mese 24, verranno impiegati per l'analisi statistica dei dati, interpretazione dei risultati e loro eventuale disseminazione (abstracts e pubblicazioni).

#### *VALORE AGGIUNTO DEL PROGETTO RISPETTO ALLE CONOSCENZE ATTUALI*

L'ipotesi attualmente più accreditata suggerisce che l'incremento del rischio di sviluppare tumore mammario in "rotating shift workers" sia dovuto all'inibizione della sintesi di melatonina, che normalmente esercita un'azione oncostatica grazie alle sue proprietà antiossidanti [3]. D'altra parte, anche la ridotta biodisponibilità di vitamina D, dovuta alla diminuita esposizione alla luce solare e conseguente all'esposizione al lavoro notturno,

sembrerebbe coinvolta nell'aumento dell'incidenza del rischio di sviluppare tumore mammario [7]. Diversi dati sperimentali hanno correlato la presenza di modificazioni epigenetiche del DNA alla durata dell'esposizione al lavoro a turni [3]. Zhu e colleghi [8] riportano la prima evidenza scientifica di effetti epigenetici legati al tumore mammario in cellule polimorfonucleate del sangue (PBMC) isolate da "rotating shift workers". Recentemente uno studio di genotipizzazione analizza le singole mutazioni (SNP) su 9 geni del ritmo circadiano e ne identifica alcune strettamente associate al rischio di tumore mammario in funzione della durata di esposizione a lavoro notturno [9]. Ad oggi comunque non esiste alcun lavoro che avvalori la possibile associazione fra cambiamenti dei profili di espressione genica, lavoro notturno e suscettibilità al tumore mammario. I risultati di questo progetto potrebbero essere utili per implementare conoscenze e strumenti applicabili alla sorveglianza epidemiologica per il tumore mammario in lavoratori a rischio. Inoltre, l'inserimento di questo studio in un contesto ospedaliero, dove la maggior parte dei lavoratori assegnati a turni di lavoro notturno sono donne, costituisce un ulteriore valore aggiunto e traslazionale di questo progetto.

#### *RICADUTE APPLICATIVE E POTENZIALE IMPATTO DEI RISULTATI*

Il tumore della mammella rappresenta in Italia una neoplasia di rilevante incidenza nella popolazione generale (14%) collocandosi al primo posto tra i tumori più frequentemente diagnosticati nelle donne in tutte le fasce d'età. Il rischio di sviluppare un tumore della mammella aumenta esponenzialmente con l'età, raggiungendo un picco massimo (5,5%) nel periodo post-menopausale, tra 50 e 69 anni, anche a causa dell'accumularsi di alterazioni epigenetiche con conseguenti squilibri nell'espressione di oncogeni e di geni oncosoppressori. Questo fenomeno assume particolare rilevanza nel mondo del lavoro dove, negli ultimi decenni, si è assistito ad un progressivo invecchiamento della popolazione lavorativa richiedendo una conseguente maggiore attenzione allo sviluppo di patologie cronico-degenerative tipiche dell'età adulta, tra cui i tumori.

Nel 2007 IARC ha classificato il lavoro a turni, che comporta un'interruzione del ritmo circadiano, in classe 2A, probabilmente cancerogeno per l'uomo, in particolare in relazione al tumore della mammella nella donna. In considerazione dell'elevato numero di lavoratrici del comparto sanitario impiegate nel lavoro notturno, la presente proposta di ricerca intende individuare un metodo d'indagine di fattori genetici ed epigenetici per l'analisi epidemiologica in risposta al lavoro notturno. Inoltre, la somministrazione di questionari ad hoc per la valutazione dell'affaticamento mentale associato ai turni notturni consentirà di

stimare l'influenza del carico di lavoro sul livello di rischio da lavoro notturno nel personale sanitario.

I dati ottenuti dall'approfondimento laboratoristico e dalla stratificazione del rischio nella tipologia di lavoratori in esame saranno d'importanza cruciale nel definire una valutazione del rischio lavorativo sempre più personalizzata, con importanti ricadute su una prevenzione oncologica all'interno dell'ambiente di lavoro da affiancare alle attuali metodiche di screening disponibili.

Inoltre, l'approccio proposto da questo progetto potrebbe aiutare a gestire il probabile forte impatto sulla gestione del rischio lavorativo, in ambito sanitario e non, con importanti ricadute su: 1) la prevenzione primaria; 2) la diagnosi precoce e il monitoraggio estensivo dei soggetti iper-suscettibili (prevenzione secondaria); 3) il reinserimento lavorativo di soggetti con diagnosi di tumore mammario (prevenzione terziaria).

#### *FATTIBILITÀ/CRITICITÀ DELLE SOLUZIONI PROPOSTE*

La fattibilità delle soluzioni proposte nell'ambito del progetto è incentrata principalmente sull'expertise degli Enti coinvolti e, in particolar modo, sull'applicazione da parte degli stessi di procedure operative standardizzate (SOPs) e già precedentemente validati per altri studi. L'approccio multidisciplinare basato sulle competenze complementari e sulla sinergia tra i diversi gruppi di ricerca rappresenta un punto di forza e di garanzia del buon esito del progetto stesso.

L'analisi dei profili di espressione genica e delle modificazioni epigenetiche in PBMC potrebbe presentare come maggiore criticità l'inadeguatezza della quantità di campione prelevato. Tale problema verrà risolto mettendo a punto le procedure analitiche su un gruppo pilota di 10 campioni al fine di valutare la necessità di incrementare la quantità di campione da prelevare.

Una ulteriore criticità è rappresentata dal fatto che i potenziali effetti del lavoro a turni sulle variazioni trascrittomiche correlate al tumore mammario potrebbero essere mascherati (e quindi non identificabili) da altri fattori di rischio o fattori confondenti, quali ad esempio l'età e stile di vita. Per superare tale criticità le analisi statistiche necessarie per individuare le variazioni trascrittomiche/epigenetiche strettamente correlate al lavoro a turni, verranno eseguite applicando degli opportuni fattori di correzione.

#### **PRODOTTI ATTESI E LORO TRASFERIBILITÀ (max 1 pg)**

Il concetto di medicina personalizzata è stato definito dalla "Food and Drug Administration" (FDA) come una pratica emergente della medicina che utilizza i profili omici ottenuti

mediante le cosiddette tecnologie “high throughput” (genomica, epigenomica, trascrittomica, proteomica e metabolomica) per guidare le decisioni prese in materia di prevenzione, diagnosi e trattamento preferibilmente delle patologie oncologiche (<http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/PrecisionMedicine/default.htm>). I marcatori individuati (DNA, mRNA, etc.) con questi approcci possono essere identificati utilizzando liquidi biologici (ad esempio sangue, urine) mediante un approccio mini-invasivo che non richiede il prelievamento di cellule del tumore stesso.

Lo scopo di questo progetto sarà quello di studiare la correlazione tra lavoro a turni e le modificazioni geniche/trascrittomiche di geni potenzialmente coinvolti nella patogenesi del tumore mammario in PBMC circolanti di donne operanti principalmente nel settore sanitario.

In questa ottica e grazie all'azione congiunta di più figure professionali appartenenti a diversi enti coinvolti questo progetto si integra a pieno sia con la progettualità della struttura che con le finalità della LILT nell'ambito del Programma Nazionale della Ricerca Sanitaria 2014-16.

In particolare, ci aspettiamo che i risultati di tale studio aiutino sia a chiarire il nesso causale fra il lavoro a turni ed il rischio di sviluppo di tumore mammario, che ad aprire nuove possibilità gestionali per l'applicazione della medicina personalizzata alle attività della medicina del lavoro.

Inoltre, i risultati di questo studio porteranno all'identificazione di biomarcatori che saranno traslabili rapidamente alla pratica clinica offrendo metodi utili sia alla sorveglianza sanitaria che epidemiologica del rischio di tumore mammario nelle lavoratrici esposte a lavoro a turni.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Ban KA, Godellas CV. Epidemiology of breast cancer. *Surg Oncol Clin N Am* 2014;23:409-22.
2. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 98: Painting, Firefighting and Shiftwork. International Agency for Research on Cancer Published by World Health Organization, 2010. ISBN: 978-92-832-1298-0.
3. Kochan DZ, Kovalchuk O. Circadian disruption and breast cancer: an epigenetic link? *Oncotarget* 2015;6:16866-82.
4. Schernhammer ES, Laden F, Speizer FE, Willett WC, Hunter DJ, Kawachi I, et al. Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1563-8.
5. Davis S, Mirick DK, Stevens RG. Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:1557-62.

6. Kamdar BB, Tergas AI, Mateen FJ, Bhayani NH, Oh J. Night-shift work and risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2013;138:291–301.
7. PAPER PER VITD
8. Zhu Y, Stevens RG, Hoffman AE, Tjonneland A, Vogel UB, Zheng T, Hansen J. Epigenetic impact of long-term shiftwork: pilot evidence from circadian genes and whole-genome methylation analysis. *Chronobiol Int* 2011;28:852-61.
9. Monsees GM, Kraft P, Hankinson SE, Hunter DJ, Schernhammer ES. Circadian genes and breast cancer susceptibility in rotating shift workers. *Int J Cancer* 2012;131:2547-52.
10. Piccolo SR, Andrulis IL, Cohen AL, Conner T, Moos PJ, Spira AE, Buys SS, Johnson WE, Bild AH. Gene-expression patterns in peripheral blood classify familial breast cancer susceptibility. *BMC Med Genomics* 2015;8:72.