

## **Valutazione comparata del rischio oncologico in aree ad alto impatto ambientale del sud Italia.**

### **Premesse e rationale**

La pericolosità di un composto tossico è potenziata dalla sua persistenza e capacità di diffusione nell'ambiente, nonché dalla tendenza ad accumularsi progressivamente nei vari organismi dai primi gradini della catena alimentare fino all'uomo, come è il caso ad esempio delle diossine. Nel corso degli anni si è teorizzato che la modalità di esposizione più importante risulti essere quella alimentare, soprattutto se l'alimentazione è basata più su prodotti di origine animale a causa del bioaccumulo attraverso la catena alimentare. (1)

Negli anni passati vi è stato un disastro ambientale provocato dalla illegale gestione dei rifiuti tossici e non nei comuni della Terra dei fuochi (province di Caserta e Napoli) (2-3), per monitorare e valutare eventuali danni alla popolazione residente in quei comuni, l'Istituto Tumori di Napoli e l'Istituto Zoprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, entrambi Istituti a carattere scientifico, hanno stipulato una convenzione ed attivato uno studio epidemiologico sulla esposizione della popolazione suscettibile (progetto SPES, vedi allegati). Si tratta di uno studio che partendo dalle matrici ambientali programma una valutazione dell' rischio oncologico nelle popolazioni dei comuni nelle aree territoriali di Napoli e Caserta caratterizzate da inquinamento da rifiuti tossici.

Estremamente utile sarebbe poter estendere lo studio per valutare e comparare i dati del progetto SPES con popolazioni del sud Italia residenti in aree con inquinamento di tipo industriale diverso (raffinerie) quali quelle della Sicilia Orientale ( Province di Catania e Messina)

### **Ipotesi scientifica**

Per capire la relazione tra le nuove vulnerabilità ambientali ed alimentari e danni alla salute non ci si può solo affidare agli strumenti classici utilizzati sinora (analisi epidemiologica di eventi patologici complessi e multifattoriali quali il cancro) poiché i tempi di analisi non sono compatibili con l'urgente necessità di prevenzione. Bisogna piuttosto ricorrere a nuovi strumenti analitici che identifichino i segni precoci di sviluppo di malattia prima della manifestazione clinica. E' noto che gli stimoli ambientali e quelli legati ai diversi stili di vita possono determinare modificazioni epigenetiche del DNA risultando in un'alterazione dell'omeostasi cellulare. Su queste basi, nel presente progetto ci proponiamo di studiare l'espressione di alcuni marcatori epigenetici, quali i microRNA rilasciati nel plasma nonché alcuni biomarcatori associati all'esposizione ambientale.(4-6)

### **Obiettivi**

Il nostro studio di bio-monitoraggio ha come obiettivo quello di valutare se il danno ambientale possa essere misurato attraverso l'utilizzo di biomarcatori (esposizione e/o effetto) che permettano

la valutazione precoce del rischio oncologico nelle aree della Campania e Sicilia associato all'esposizione ambientale provocata da smaltimento di rifiuti tossici e di scorie industriali nonché all'esposizione ambientale in prossimità di insediamenti industriali di raffinazione.

### **Materiali e metodi**

Il disegno dello studio si basa su valutazioni integrate di soggetti sani residenti in aree (cluster) a diverso indice di pressione ambientale. La metodologia utilizzata afferisce agli studio di biomonitoraggio trasversale con un campionamento proporzionale stratificato delle classi giovanili (20-49), in un'ottica di prevenzione primaria. Gli stessi test di biomonitoraggio saranno effettuati sulla popolazione residente nei comuni a diverso indice di inquinamento (alto, medio e basso). La fascia di età presa in considerazione (20-49) permette di correlare al meglio sia gli stili di vita sia l'esposizione ai rischi lavorativi rilevate dai questionari ad hoc

E' prevista la definizione di aree con differente livello di impatto ambientale (alto, medio e basso). Per garantire una adeguata potenza nel confronto tra aree è stato definito un rapporto a priori nel reclutamento per le diverse aree pari a 4:2:1 per le corrispondenti aree alto, medio e basso impatto. Per ciascuna area sono stati definiti differenti cluster di esposizione e una numerosità pari a 200 soggetti in modo da garantire il rapporto di reclutamento totale di 4600 cittadini (4200 dello studio SPES + 400 nei cluster della Sicilia orientale) tra le differenti aree di impatto ambientale. Le numerosità sopra indicate hanno una potenza del 80%, considerando un livello di significatività del 5%, con una variabile di esito continua di identificare una deviazione standard tra le medie calcolate per le tre differenti aree di impatto pari a 0.05 (ipotizzando una deviazione standard della variabile continua pari a 1). Le variabili di stratificazione del campione sono il comune di residenza, il sesso e l'età. (7)

### **Modalità di misurazione dei risultati**

Alla popolazione oggetto di studio verranno richieste in maniera approfondita informazioni circa l'anamnesi familiare, personale, patologica, lavorativa, e sui luoghi di residenza/lavoro abituali. Dettagliate informazioni circa le abitudini alimentari verranno esplorate in dettaglio usando questionari riconosciuti e validati.

In coerenza con gli obiettivi del progetto e con le partnership del gruppo di lavoro prenderemo in considerazione i seguenti biomarcatori eseguiti su sangue periferico :

<b>BIOMARCATORI</b>	Metalli pesanti – ICP-MS
<b>DI ESPOSIZIONE</b>	Dioassine –Calux, HRGC

<b>BIOMARCATORI DI EFFETTO BIOLOGICO</b>	Valutazione lunghezza telomerica Valutazione stress ossidativo Valutazione profilo citochinico Valutazione Matelazione DNA
<b>BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITA' GENETICA</b>	Micronuclei Polimorfismi

Le modalità di analisi dei su indicati biomarcatori sono riportate nell'allegato progetto SPES. I laboratori dove verrà svolta l'analisi dei miRNA sono allocati presso i locali del Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche dell'Università di Catania. Tali laboratori sono propri della LILT di Catania e regolati da una convenzione tra la Sezione Provinciale della LILT di Catania e l'Università di Catania. L'analisi di espressione dei miRNAs verrà effettuata sui campioni di plasma isolati dal sangue periferico proveniente da ciascun soggetto. Tale analisi verrà effettuata mediante lo Human Serum & Plasma miScript miRNA PCR Array (Qiagen). Ciò permetterà di identificare i profili di espressione di 84 miRNAs generalmente modulati nei tumori umani.

#### **Analisi statistica dei dati**

Verrà utilizzato il test del Chi-Quadro per valutare l'associazione/ dipendenza tra variabili di tipo qualitativo, il test T-Student per valutare differenze su parametri continui. Il coefficiente di correlazione di Spearman calcolerà quanto due o più variabili sono tra loro correlate (1 max correlazione) e il valore di p associato. Per valutare la differenza fra più gruppi di dati, o fra le singole osservazioni appartenenti ai gruppi (cluster), verrà utilizzato il test di Kruskal-Wallis. L'analisi multivariata verrà utilizzata per stimare il rischio di esposizione per i soggetti residenti nei cluster ad alto e medio impatto verso il gruppo di riferimento (soggetti residenti nel cluster a basso impatto). Un valore del rischio  $> 1$  o  $< 1$  denoterà, rispettivamente, un più alto o più basso rischio di avere/sviluppare una peggiore condizione (es.: malattia, elevata concentrazione di contaminanti, ecc.). Il modello utilizzato sarà quello della regressione logistica, aggiustato per le principali variabili di confondimento ed includerà gli elementi risultati significativi nell'analisi univariata. Inoltre la significatività tra cluster sarà valutata confrontando i valori della verosimiglianza del modello stimato. Il valore p-value  $\leq 0.05$  sarà considerato significativo. (7-9) L'analisi statistica verrà eseguita mediante utilizzo del Software statistico SPSS (version 23.0 Inc., IL, USA).

## Bibliografia

1. Steenland, K., et al., *Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen*. Environ Health Perspect, 2004. **112**(13): p. 1265-8.
2. De Felip, E., et al., *Priority persistent contaminants in people dwelling in critical areas of Campania Region, Italy (SEBIOREC biomonitoring study)*. Sci Total Environ, 2014. **487**: p. 420-35.
3. WHO Regional Office for Europe et al. *"Trattamento dei rifiuti in Campania: impatto sulla salute umana. Studio Pilota: Sintesi dei risultati e indicazioni preliminari"*.
4. Wild C., *The exposome: from concept to utility*. Int J. Epid, 2012. **41**: 24-32.
5. Vineis P., *Exposomics: mathematics meets biology*. Mutagenesis, 2015. **30**(6) : 719-722.
6. Vineis P, Van Veldhoven K, Chadeau-Hyam M, Athersuch TJ. *Advancing the application of omics-based biomarkers in environmental epidemiology*. Environ Mol Mutagen, 2013. **54**(7) : 461-467.
7. Perera, F.P., *Molecular epidemiology and prevention of cancer*. Environ Health Perspect, 1995. **103 Suppl 8**: p. 233-6.
8. Gray RJ. *A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk*. Ann Stat. **16**:1141–1154, 1988.
9. Harrell F. *Regression modelling strategies with applications to linear models, logistic regression, and survival analysis*, New York: Springer-Varlag, 2001.