



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
DELLA PREVENZIONE
XXVIII CICLO

Biomarcatori per il monitoraggio biologico di
soggetti esposti ad agenti cancerogeni per il
polmone

Coordinatore:
Chiar.mo Prof.re Antonio Mutti

Tutor:
Chiar.mo Prof.re Matteo Goldoni

Dottoranda:
Iris Banda

Ai miei genitori, Vasil e Arta

A mio fratello Marian

Ai miei nonni

Riassunto

I biomarcatori o “marcatori biologici” svolgono un ruolo fondamentale nel monitoraggio biologico. In questo lavoro ci siamo soffermati sullo studio di *biomarcatori di effetto e di esposizione* a xenobiotici ambientali.

Nel primo caso abbiamo valutato i micro RNA (miRNA) da utilizzare per la diagnosi precoce del tumore al polmone in matrici di facile accesso, quale il CAE e il plasma, utilizzando il miRNA-21, oncogeno, e il miRNA-486, oncosoppressore. I risultati evidenziano una loro capacità di distinguere correttamente i soggetti con tumore polmonare dai soggetti sani, ipotizzando un loro utilizzo a scopo diagnostico.

Nella seconda parte del lavoro di tesi sono stati studiati i *biomarcatori di esposizione* a benzene per valutare gli effetti dell'esposizione a concentrazioni ambientali su bambini residenti in città e a diverso livello di urbanizzazione. Lo studio ha evidenziato una correlazione dose-effetto fra le concentrazioni di benzene e dei suoi metaboliti urinari e un danno ossidativo a livello degli acidi nucleici. Tuttavia, le concentrazioni di benzene urinario non sono influenzate dal grado di industrializzazione, a differenza dell'S-PMA e degli indicatori di stress ossidativo (8-oxodGuo e 8-oxoGuo) che sembrano risentire sia della residenza che del momento del campionamento.

Infine abbiamo ricercato possibili *biomarcatori di esposizione* a vinilcicloesene (VCH), sottoprodotto industriale nella polimerizzazione del 1,3-butadiene, poiché non sono ancora stati proposti BEI di riferimento nonostante i bassi valori di TLV-TWA (0.1 ppm) proposti dall'ACGIH. Nella prima fase del lavoro abbiamo studiato i meccanismi di tossicità del VCH tramite modelli *in vitro*, testando varie linee cellulari. I risultati evidenziano come la dose reale di VCH sia di molto inferiore a quella nominale per effetto dell'evaporazione. Inoltre, nelle linee cellulari più sensibili si sono evidenziati effetti citostatici, con alterazioni del ciclo cellulare, a differenza dell'esposizione agli epossidi del VCH, il VCD e l'1,2-VCHME, che determinano lisi cellulare con IC₅₀ di 3 ordini di grandezza inferiori a quelli del VCH. La quantificazione dei metaboliti di I fase e di II fase del VCH nelle linee cellulari epatiche ha evidenziato

concentrazioni di circa 1000 volte inferiori a quelle del VCH confermando come la sua tossicità sia principalmente dovuta alla produzione degli intermedi epossidici. La trasformazione nei metaboliti di II fase conferma inoltre l'effetto detossificante del metabolismo.

La trasferibilità dei risultati ottenuti *in vitro* su sistemi *in vivo* fornirà le basi per poter identificare possibili metaboliti da proporre per il monitoraggio biologico di lavoratori esposti a VCH.

PAROLE CHIAVE: biomarcatori di effetto e di esposizione, tumore al polmone, miRNA, benzene, vinilcicloesene.

Abstract

Biomarkers or “biological markers” play a crucial role in biological monitoring. In this thesis, we have focused on the analysis of biomarkers of effect and exposure to environmental xenobiotics.

In the first part, we have evaluated the micro RNA (miRNA) as a potential tool for the early diagnosis of lung cancer in not invasive matrices -such as CAE and plasma-. In particular, we have investigated the miRNA-21, an oncogene, and the miRNA-486, a tumor suppressor. The results showed their ability to correctly distinguish people with lung cancer from healthy ones, suggesting that they might be used for diagnostic purposes.

In the second part of our work, biomarkers of exposure of benzene have been studied in order to evaluate the effects of exposure to environmental concentration of benzene in children living in cities with different degrees of urbanization. The study has shown a dose-effect correlation between the concentration of benzene and its urinary metabolites and has also shown an oxidative damage to nucleic acids. However, the urinary concentrations of benzene were not affected by the degree of urbanization, in contrast with S-PMA and with the oxidative stress indicators (8-oxodGuo e 8-oxoGuo) which seem to be affected both by the place of living and by the sampling timing.

Finally, we have investigated the possible biomarkers of exposure to vinylcyclohexene (VCH), an industrial byproduct of the polymerization of 1,3-butadiene, since reference BEI haven't been proposed yet, despite the low values of TLV-TWA (0.1 ppm) suggested by ACGIH.

In the first part of the work on VCH, we have been studying VCH mechanisms of toxicity by *in vitro* models, testing different cell lines. The results showed how the real dose of VCH is lower than the nominal one, because of the evaporation effect. Moreover, in the most sensitive cell lines, cytostatic effects have been noticed, together with cell cycle alterations, in contrast with the exposure to the epoxides of VCH, VCD and 1,2-VCHME, which determine cells lysis with a IC_{50} 3 times lower than the one of the VCH.

The quantification of the metabolites of phase I and II of the VCH in the hepatic cell line has highlighted concentrations 1000 times lower than the concentration of VCH, confirming that its toxicity is mainly caused by the production of epoxide intermediates. Furthermore, the transformation in the metabolites of phase II confirmed the detoxification effect of the metabolism.

The transferability of the results obtained by *in vitro* approach to *in vivo* systems will represent the baseline to identify possible metabolites to propose for the biological monitoring of workers exposed to VCH.

KEY WORDS: biomarkers of effect and exposure, lung cancer, miRNA, benzene, vinylcyclohexene.

INDICE

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE	1
1.1 Valutazione del rischio: monitoraggio ambientale e monitoraggio biologico	2
1.2 Biomarcatori	5
<i>1.2.1 Classificazione dei biomarcatori</i>	5
1.3 Valori di riferimento per l'esposizione professionale	7
CAPITOLO 2. BIOMARCATORI PER LA DIAGNOSI PRECOCE DEL TUMORE AL POLMONE	11
2.1 INTRODUZIONE	11
2.1.2 Generalità del tumore del polmone	12
<i>2.1.2.1 Epidemiologia</i>	12
<i>2.1.2.2 Fattori di rischio</i>	13
2.1.3 Patogenesi	17
2.1.4 Classificazione dei tumori polmonari	20
2.1.5 Manifestazioni cliniche	22
2.1.6 Stadiazione e prognosi	22
2.1.7 Diagnosi	25
<i>2.1.7.1 Diagnosi precoce: il passato</i>	27
<i>2.1.7.2 Diagnosi precoce: il presente</i>	29
<i>2.1.7.3 Approccio molecolare alla diagnosi precoce</i>	31
2.1.8 Il condensato dell'aria esalata	34
<i>2.1.8.1 Il condensato dell'aria esalata: nuova prospettiva</i>	34
<i>2.1.8.2 Il condensato dell'aria espirata: meccanismi di formazione</i>	36

2.1.9 Il plasma	38
2.1.10 I microRNA	39
2.1.10.1 <i>miRNA e cancro</i>	40
2.1.10.2 <i>miRNA-21 e miRNA-486</i>	42
2.2 OBIETTIVO DEL LAVORO	45
2.3 MATERIALI E METODI	47
2.3.1 Reclutamento dei pazienti	47
2.3.2 Raccolta del condensato dell'aria espirata	49
2.3.3 Estrazione miRNA	49
2.3.3.1 <i>Estrazione miRNA da tessuti</i>	49
2.3.3.2 <i>Estrazione dei miRNA da plasma</i>	50
2.3.3.3 <i>Estrazione dei miRNA dal condensato dell'aria espirata</i>	51
2.3.4 Digestione miRNA con DNasi I	51
2.3.5 Retrotrascrizione dei miRNA	52
2.3.6 Preamplificazione per i miRNA estratti dal condensato dell'aria espirata	52
2.3.7 Quantificazione dei miRNA con sonde TaqMan	53
2.3.8 Quantificazione dei miRNA con tecnica di Real Time PCR	53
2.3.9 Analisi statistica	54
2.4 RISULTATI	55
2.4.1 Espressione del miRNA-21 e miRNA-486 nel tessuto	55
2.4.2 Espressione del miRNA-21 e miRNA-486 a livello del plasma	55
2.4.3 Espressione del miRNA-21 e miRNA-486 a livello del condensato dell'aria espirata	58
2.5 DISCUSSIONE	61

2.6 CONCLUSIONI	67
CAPITOLO 3. BIOMARCATORI URINARI DI ESPOSIZIONE E DANNO OSSIDATIVO NEI BAMBINI ESPOSTI A BASSE CONCENTRAZIONI DI BENZENE	68
3.1 INTRODUZIONE	68
3.1.1 Assorbimento e distribuzione	70
3.1.2 Metabolismo ed eliminazione	71
3.1.3 Effetti dell'esposizione a benzene	72
3.1.4 Possibili meccanismi di danno indotti dal benzene	73
3.1.4.1 <i>Danno ossidativo al DNA</i>	73
3.1.4.2 <i>Metilazione degli acidi nucleici</i>	74
3.1.5 Tossicità da esposizione a basse dosi di benzene	76
3.1.6 Gli indicatori di esposizione a basse dosi di benzene	77
3.2 OBIETTIVO DELLO STUDIO	82
3.3 MATERIALI E METODI	83
3.3.1 Disegno dello studio e popolazione esposta	83
3.3.2 Monitoraggio ambientale	83
3.3.3 Monitoraggio biologico	83
3.3.4 Determinazione del MTBE	84
3.3.5 Determinazione dei metaboliti urinari del benzene	84
3.3.6 Determinazione della cotinina urinaria	85
3.3.7 Determinazione degli indicatori di stress ossidativo	86
3.3.8 Determinazione degli indicatori di metilazione degli acidi nucleici	87
3.3.9 Analisi statistiche	88

3.4 RISULTATI	89
3.4.1 Monitoraggio ambientale	89
3.4.2 Monitoraggio biologico	89
3.4.3 Indicatori di esposizione	89
3.4.4 Indicatori urinari di danno ossidativo agli acidi nucleici	92
3.4.5 Indicatori urinari di metilazione degli acidi nucleici	94
3.5 DISCUSSIONE	100
3.6 CONCLUSIONI	105
CAPITOLO 4. MODELLI <i>IN VITRO</i> PER LO STUDIO DELLA TOSSICITÀ DEL VINILCICLOESENE	106
4.1 INTRODUZIONE	106
4.1.1 Proprietà chimico-fisiche del VCH	107
4.1.2 Metabolismo e tossicocinetica	108
4.1.3 Studi di esposizione <i>in vivo</i>	110
4.1.3.1 <i>Esposizione acuta, subcronica e cronica</i>	110
4.1.3.2 <i>Cancerogenicità e Genotossicità</i>	113
4.1.3.3 <i>Effetti a livello riproduttivo e dello sviluppo</i>	114
4.1.4 Biopersistenza del VCH	115
4.1.5 Esposizione professionale dei lavoratori	115
4.2 OBIETTIVO DELLO STUDIO	117
4.3 MATERIALI E METODI	118
4.3.1 Disegno sperimentale dello studio	118
4.3.2 Agenti chimici	120
4.3.3 Colture cellulari e trattamenti	120

4.3.4	Valutazione della citotossicità	121
4.3.5	Valutazione del ciclo cellulare	121
4.3.6	Estrazione RNA totale	122
4.3.7	Digestione con DNase I	122
4.3.8	Visualizzazione RNA in elettroforesi	123
4.3.9	Retrotrascrizione dell'RNA totale in cDNA	123
4.3.10	Quantificazione dei trascritti in Real Time PCR	123
4.3.11	Analisi SPME-GC-MS	125
4.3.11.1	<i>Procedura SPME</i>	125
4.3.11.2	<i>Spettrometria di massa accoppiata a gas cromatografia (GC/MS)</i>	125
4.3.11.3	<i>Ottimizzazione e validazione dei parametri SPME per VCH e VCD</i>	126
4.3.12	Analisi LC-MS/MS	127
4.3.13	Analisi statistica	129
4.4	RISULTATI	130
4.4.1.	Studio dell'effetto della struttura chimica sulla tossicità del VCH	130
4.4.1.1	<i>Curve di vitalità del VCH, del VCA, dello Sty</i>	130
4.4.1.2	<i>Determinazione dei valori di Benchmark Dose e Lower Benchmark Dose per il VCH, VCA e Sty</i>	131
4.4.1.3	<i>Determinazione degli effetti a livello cellulare</i>	132
4.4.1.4	<i>Determinazione dell'espressione genica a livello del ciclo cellulare</i>	134
4.4.2.	Determinazione della biodisponibilità del VCH <i>in vitro</i>	135
4.4.2.1	<i>Determinazione della concentrazione reale rispetto alla concentrazione nominale</i>	135

4.4.2.2 <i>Coefficiente di ripartizione medium/aria (λ_m/a) e cinetica di evaporazione</i>	137
4.4.2.3 <i>Determinazione della percentuale della concentrazione intracellulare</i>	138
4.4.3. <i>Determinazione dei metaboliti di fase I e di fase II del VCH</i>	139
4.4.3.1 <i>Identificazione dei metaboliti di fase I in GC-MS</i>	139
4.4.3.2 <i>Studio di stabilità del 1,2-VCHME e del VCD nel medium cellulare</i>	140
4.4.3.3 <i>Identificazione dei metaboliti di fase II in LC-MS/MS</i>	142
4.4.3.4 <i>Quantificazione di alcuni metaboliti di fase I e di fase II nelle linee cellulari trattate con VCH</i>	143
4.4.3.5 <i>Curve di vitalità dei metaboliti del VCH</i>	144
4.4.3.6 <i>Determinazione dei valori di Benchmark Dose e Lower Benchmark Dose per i metaboliti del VCH</i>	146
4.5 DISCUSSIONE	148
4.6 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	153
5. BIBLIOGRAFIA	155

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

L'uomo, gli animali e le piante sono esposti ad una enorme varietà di sostanze chimiche estranee all'organismo, o xenobiotici, che possono essere di origine naturale o antropogenica. L'uso di sostanze chimiche elaborate dall'uomo e la loro immissione nell'ambiente, non è certo una pratica recente, tuttavia solo verso la metà del 1900 il fenomeno ha assunto dimensioni più preoccupanti.

Nel XX secolo l'enorme crescita del comparto industriale e il conseguente aumento dell'inquinamento ambientale hanno esteso lo studio della tossicologia, sino ad allora di interesse strettamente occupazionale, all'intera popolazione. Inoltre, il miglioramento del benessere sociale e la quasi totale accessibilità a prodotti chimici e a nuove tecnologie espongono, oggi, la totalità degli individui al "contatto" con innumerevoli sostanze tossiche.

Nonostante si siano raggiunti buoni standard di qualità dell'aria, l'elevata tossicità intrinseca e/o carattere cancerogeno di diverse sostanze chimiche, obbligano, comunque, la comunità scientifica e gli organi di controllo nazionali e internazionali a valutare l'esposizione della popolazione generale ed il rischio per la salute ad esso associato.

Virtualmente ogni sostanza chimica, conosciuta e non, può produrre un danno o la morte se presente in concentrazioni sufficientemente elevate. Inoltre, tutte le sostanze sono potenzialmente tossiche e la dose è un fattore discriminante per determinare quando una sostanza produce effetti indesiderati, danni severi o la morte. In tal caso, possiamo ricordare il concetto attribuito a Paracelso secondo cui "tutto è veleno, nulla è veleno: soltanto la dose fa il veleno". In altri termini è biologicamente accettabile la possibilità che esposizioni dell'organismo estremamente basse possano essere tollerate senza effetto apprezzabile sulla complessiva omeostasi delle funzioni vitali. Per produrre una manifestazione tossica, un agente chimico o un suo metabolita deve potere interagire con specifici siti dell'organismo ed essere presente in una appropriata concentrazione per un periodo sufficientemente lungo: perciò l'eventuale

manifestazione tossica dipende dalle proprietà chimico-fisiche dell'agente chimico, dall'esposizione e dalla sensibilità del sistema biologico.

Particolarmente importante è anche la via di assunzione della sostanza. Le più importanti vie attraverso cui gli agenti tossici hanno accesso nell'organismo animale sono: il tratto intestinale, i polmoni, la pelle o le branchie nel caso dei pesci.

1.1 Valutazione del rischio: monitoraggio ambientale e monitoraggio biologico

Il rilevamento dell'esposizione a sostanze chimiche e la stima dell'impatto che tali tossici hanno sulla salute pubblica prevedono l'utilizzo di due differenti approcci, ovvero il monitoraggio ambientale e il monitoraggio biologico. Come ricordato dalle linee guida per il monitoraggio biologico della Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale (Mutti, 2013), la valutazione del rischio consiste nel caratterizzare i potenziali effetti nocivi dell'esposizione umana a rischi ambientali e si articola in quattro fasi: (1) *identificazione degli agenti di rischio*, per valutare se gli stessi possano essere causa di danno per la salute; (2) *definizione della/e relazione/i dose-risposta*, allo scopo di individuare la relazione tra l'entità della dose o il livello di esposizione all'agente di rischio e la frequenza di un particolare effetto nocivo nella popolazione esposta (risposta biologica dell'organismo); (3) *valutazione dell'esposizione*, stimata in modo qualitativo o quantitativo (con misure in questo secondo caso di monitoraggio ambientale e biologico); (4) *caratterizzazione del rischio*, per valutare la probabilità e la gravità di eventuali danni per la salute dei soggetti esposti ad una data dose o concentrazione.

In questo lavoro ci siamo soffermati principalmente sul terzo punto e sulla definizione di monitoraggio ambientale e monitoraggio biologico. In entrambe le situazioni, il termine "monitoraggio" mette in risalto la periodicità delle misure effettuate, ossia la necessità di fare campionamenti in diversi momenti temporali per tenere conto dell'andamento dei livelli di esposizione in funzione di sopraggiunte variazioni nell'ambiente lavorativo o nei processi produttivi.

Per *monitoraggio ambientale* (MA) si intende una misura periodica di un inquinante ambientale nell'ambiente di interesse, con lo scopo di confrontare i dati ottenuti con appropriati valori standard (Mutti, 2013). Tale misura rappresenta una concentrazione media pesata nel tempo (per esempio, durata 8 ore lavorative) di una sostanza chimica nell'aria o in altre matrici ambientali (acqua, cibo, terreno, ecc) ed è una fase necessaria per identificare le sorgenti di esposizione e per facilitare le misure utili per minimizzare le emissioni (Angerer *et al.*, 2007). Tuttavia, non sempre il MA è sufficiente a valutare il reale rischio di introduzione di xenobiotici nell'organismo, in quanto vi sono svariate variabili che possono intervenire: le condizioni fisiologiche, eventuali malattie, funzionalità o corretto uso dei dispositivi di protezione individuale, ecc.

Per quanto riguarda il *monitoraggio biologico* (MB), ci sono differenti definizioni che derivano da diversi autori. Il MB tradizionale è definito come la misura periodica di un composto tossico o dei suoi metaboliti in matrici biologiche accessibili, allo scopo di confrontare i livelli misurati con opportuni standard di riferimento (Manini *et al.*, 2007; Mutti, 2013). Allo stesso modo, il MB è visto come un'attività continua o ripetitiva ma sistematica di raccolta di campioni biologici, per l'analisi in essi di inquinanti, metabolici o specifici parametri che descrivono effetti biologici avversi per un'amplificazione immediata, allo scopo di valutare l'esposizione e i rischi per la salute della popolazione esposta in esame, confrontando i dati ottenuti con appositi riferimenti e, se necessario, impostare azioni correttive (Angerer *et al.*, 2007). Il MB, se condotto accuratamente, può fornire un'immagine nitida della qualità della sostanza tossica in esame realmente assorbita dall'organismo (dose interna). Grazie allo sviluppo tecnologico nel campo della chimica analitica, è oggi possibile arrivare a quantificare concentrazioni estremamente basse di sostanze tossiche in matrici biologiche, fino ad una parte per trilione/quadrilione (Paustenbach & Galbraith, 2006). Infine, il MB può essere diviso in tre categorie (Jakubowski & Trzcinka-Ochocka, 2005): (1) *monitoraggio biologico dell'esposizione*: consiste nella determinazione di una sostanza o di suoi metaboliti in un campione biologico; (2) *monitoraggio*

biologico di effetti: quantificazione degli effetti biologici non avversi e reversibili; (3) *monitoraggio biologico della dose effettiva*: misura della quantità di una sostanza tossica che interagisce con uno specifico bersaglio (“*target*”).

Inoltre, la quantificazione indiretta dell’esposizione ad agenti chimici di varia natura, MB, viene effettuata utilizzando come indicatori (di dose e/o di accumulo) le sostanze tossiche come tali ed i loro metaboliti o prodotti di trasformazione in fluidi o tessuti biologici; possono essere utilizzati a tale scopo anche eventuali effetti biochimici indotti dai tossici (indicatori di effetto), una volta che sia nota e sufficientemente quantificabile la loro correlazione con l’esposizione stessa. La misura dell’indicatore biologico può essere effettuata nell’aria espirata, nell’urina, nel sangue od in altri campioni biologici prelevati sul lavoratore esposto.

A seconda dell’indicatore determinato, del tipo di campione scelto e del periodo nel quale viene effettuato il prelievo, la misura fornisce indicazioni relative all’intensità dell’esposizione recente, all’esposizione media giornaliera o all’esposizione cronica cumulativa.

Diversi autori in diversi studi concordano che il MA e il MB siano attività complementari in quasi tutte le attività di valutazione del rischio. Il MB è in grado di fornire informazioni essenziali per una corretta definizione dell’esposizione a composti tossici e l’uso d’indicatori biologici deve essere considerato un elemento centrale nella valutazione del rischio (Mutti, 2013). Di fatto, le misure di MA e MB servono a quantificare rispettivamente l’esposizione e la dose assorbita. Tuttavia, in certi casi il MB viene considerato solo secondario al MA per diverse ragioni (Jakubowski e Trzcinka-Ochocka, 2005): si ritiene che il MB sia più costoso del MA e l’utilizzo di alcuni campioni biologici, come il sangue, possono non essere accettati da tutti i lavoratori per svariate ragioni. Inoltre, la pianificazione del MB è più complessa del MA, in quanto bisogna tener conto della tossicocinetica e del metabolismo delle specifiche sostanze tossiche all’interno dell’organismo per decidere quali campioni biologici raccogliere e a che tempi.

1.2 Biomarcatori

La volontà di sviluppare metodi di biomonitoraggio più efficaci e rapidi rispetto ai tradizionali test e la recente evoluzione delle tecniche di biologia molecolare, ha portato la ricerca verso lo studio di nuovi indicatori biologici: i biomarcatori.

Il termine “biomarcatore” è un termine generico che indica un composto legato all’interazione tra un sistema biologico ed un agente ambientale (Jakubowski e Trzcinka-Ochocka, 2005).

In accordo con Van Gestel e Van Brummelen (1996), un biomarcatore è definito come “ogni risposta biologica ad un prodotto ambientale, ritrovata ad un livello biologico diverso a quello dell’individuo. Questa risposta deve essere misurata in un organismo e ne indica un cambiamento rispetto allo stato normale. Tale risposta non deve essere trovata in un organismo sano”. Un biomarcatore rappresenta quindi un indice dell’impatto o della presenza di uno xenobiota nell’organismo e si manifesta attraverso specifici cambiamenti molecolari, biochimici, fisiologici, istologici e morfologici nella popolazione animale e vegetale.

1.2.1 Classificazione dei biomarcatori

In accordo con l’*International Program of Chemical Safety* (ICPS) (IPCS, 2001), possono essere identificati tre classi di biomarcatori:

1. *Biomarcatori d’esposizione*: la risposta di un organismo che indica l’esposizione a un composto chimico o a una classe di composti, ma che non fornisce nessuna indicazione dei reali effetti tossicologici sull’organismo.
2. *Biomarcatori d’effetto*: è una modificazione biochimica o fisiologica, misurabile in un tessuto o in un fluido corporeo, associata ad un possibile o effettivo stato di malattia.
3. *Biomarcatore di suscettibilità*: si riferisce all’innata o all’acquisita capacità di un organismo a rispondere ad una specifica sostanza xenobiotica.

I biomarcatori di esposizione rivelano la presenza di xenobiotici o dei loro metaboliti quindi possono essere utilizzati per confermare o stimare l'esposizione di individui o popolazioni ad una particolare sostanza, fornendo un legame tra esposizione esterna e dose interna.

I biomarcatori d'effetto valutano la risposta dell'organismo e possono essere utilizzati per documentare effetti avversi dovuti all'esposizione e all'assorbimento di una sostanza chimica.

Generalmente i biomarcatori d'effetto più sensibili sono rappresentati da alterazioni nei livelli e nell'attività degli enzimi di biotrasformazione. Infatti, parallelamente all'effetto negativo della sostanza tossica, nell'organismo esposto si sviluppano delle risposte adattive che tendono a riportare il sistema ad uno stato di omeostasi. In particolare le risposte a livello molecolare tendono a diminuire l'effetto tossico del composto inquinante, grazie all'introduzione di sistemi multienzimatici o di proteine di legame. In base alla loro specificità di risposta nei confronti di composti inquinanti, i biomarcatori possono essere specifici oppure generali.

I biomarcatori specifici rappresentano l'insieme delle risposte molecolari e biochimiche che si realizzano in seguito all'esposizione ad una specifica classe di contaminanti (es. l'induzione delle metalloproteine da parte dei metalli e l'inibizione della colinesterasi dovuta all'azione specifica di alcuni pesticidi) e che permettono in questo modo di risalire al responsabile della contaminazione e in pochi casi ad un specifico contaminante.

I biomarcatori generali rappresentano risposte dell'organismo a livello molecolare, cellulare e fisiologico che non possono essere ricondotte ad un inquinante in particolare, ma rappresentano uno stato generale di stress dell'organismo (es. danni al DNA).

I biomarcatori molecolari forniscono informazioni circa le risposte degli organismi a livello di organizzazione biologica molto bassi, offrendo quindi la possibilità di ottenere indicazioni tempestive e sensibili dell'influenza dei tossici su tali sistemi.

Gli indici biologici di esposizione (IBE) considerati nel loro complesso, sono senz'altro i biomarcatori più utilizzati, introdotti dall'ACGIH e come per i TLV- (*Threshold Limit Values*, valori limite di soglia) sono sottoposti ad un aggiornamento con cadenza annuale. Essi

rappresentano i valori di riferimento del livello dell'indicatore che, con elevata probabilità, è possibile riscontrare in campioni prelevati su lavoratori sani, esposti a livelli di concentrazione nell'aria nell'ordine di grandezza del TLV-TWA. Gli IBE non rappresentano (come i TLV) una linea di demarcazione netta fra esposizione pericolosa e non pericolosa. A causa della variabilità biologica, i risultati delle misure individuali possono superare gli IBE senza che vi sia un aumento rischio per la salute. Se, tuttavia, le misure effettuate su campioni prelevati sul lavoratore in occasioni differenti, forniscono risultati costantemente superiori agli IBE, o se la maggioranza delle misure effettuate su campioni prelevati su gruppi di lavoratori addetti alla stessa mansione superano gli IBE, è necessario studiare le cause di questa anomalia e prendere adeguate misure per ridurre l'esposizione.

Per lo stesso agente chimico possono essere disponibili più IBE, comprendenti il composto tal quale od i suoi metaboliti in matrici biologiche (sangue, siero, urina, condensato dell'aria espirata) o tessuti accessibili (capelli), o gli addotti dei metaboliti reattivi al DNA o a proteine (albumina, emoglobina).

L'utilizzazione degli IBE mira a: (1) stabilire in modo inequivocabile l'esistenza di una esposizione, ossia l'avvenuto contatto dell'agente con la superficie dell'organismo; (2) ridurre o prevenire gli errori di classificazione conseguenti al ricorso a misure qualitative negli studi epidemiologici; (3) determinare la dose interna a livello di un organo, di una cellula o di una molecola critici (IPCS, 2001).

1.3 Valori di riferimento per l'esposizione professionale

In medicina occupazionale e ambientale il termine valore di riferimento sta ad indicare il valore di un determinato indicatore ottenuto dalla elaborazione statistica dei risultati del suo dosaggio in campioni biologici prelevati da una popolazione di riferimento non professionalmente esposta; a tali valori ci si riferisce per interpretare i risultati delle determinazioni dello stesso analita effettuate in individui o gruppi ad esposizione nota a solventi.

La stima quantitativa della dose assorbita da lavoratori esposti ad agenti chimici presenti nei luoghi di vita o di lavoro è di grande importanza sia per la valutazione del rischio che per la tutela della loro salute e sicurezza. Da un punto di vista fisiopatologico la dose che meglio consente di stimare il rischio di effetti tossici è quella “al bersaglio”, ossia la concentrazione della sostanza chimica nel sito d’azione, a livello di tessuto, organo o cellula, anche se nella maggior parte dei casi il bersaglio risulta inaccessibile per ovvie ragioni etiche, oltre che pratiche (Mutti, 2013). Per la determinazione della dose interna vengono effettuati il monitoraggio ambientale degli agenti aerodispersi o il monitoraggio biologico, effettuando una misura periodica degli inquinanti tal quali o dei loro prodotti di biotrasformazione (metaboliti) in matrici biologiche accessibili, tra cui il sangue, l’urina, l’aria espirata, la saliva e talvolta i tessuti. In questo ambito, i biomarcatori sono indicatori biologici di esposizione a specifiche sostanze chimiche, di cui consentono di valutare l’assorbimento (Wilson, 2002). Le misure del monitoraggio biologico forniscono un’integrazione della dose totale assorbita da tutte le possibili vie di assorbimento (inalatoria, percutanea, digerente) e tengono conto delle differenze anatomiche, biochimiche e fisiologiche, da cui dipendono le caratteristiche farmacocinetiche delle sostanze chimiche. Di conseguenza, è importante sottolineare un’ulteriore volta, il concetto che il monitoraggio ambientale e il monitoraggio biologico siano complementari e non debbono essere considerati esclusivi l’uno dall’altro.

Da anni medici del lavoro e igienisti industriali di tutto il mondo sono impegnati nella ricerca rivolta a stabilire i livelli massimi ammissibili nell’atmosfera degli ambienti di lavoro (concentrazioni massime tollerabilità) o in campioni biologici di sangue, urine, aria espirata (concentrazioni massime biologiche) che non comportino effetti indesiderati. Per i tossici industriali più noti esistono oggi tabelle di concentrazioni massime accettabili negli ambienti di lavoro, genericamente indicate con la sigla MAC (*Maximum Allowable Concentration*), che vengono periodicamente aggiornate allo scopo di mantenere condizioni il più possibile sicure ai fini della salvaguardia della salute. Le tabelle più conosciute e più

utilizzate sono quelle elaborate dalla *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH), proposte in base a criteri empirici, annualmente revisionate e riferite ai TLV.

Per "valori limite di soglia" la ACGIH intende le "concentrazioni ambientali per le quali si ritiene che quasi tutti i lavoratori possono essere esposti giorno dopo giorno per tutta la vita lavorativa senza effetti dannosi". Tali limiti, quindi, rappresentano dei parametri al di sotto dei quali ci si attende un'assenza di effetti nocivi per la salute dei lavoratori esposti. A causa di ampie differenze di sensibilità individuale si ammette che una piccola percentuale possa avere, in queste condizioni, disagio o aggravamento di malattie antecedenti o anche la comparsa di malattie professionali. Il concetto di limite tollerabile è quindi quello di *valore di riferimento* che non garantisce una sicurezza assoluta, ma una sicurezza per la maggior percentuale possibile di individui. Va ricordato che i limiti riportati sono da intendersi riferiti agli ambienti di lavoro e quindi applicabili per soggetti adulti, sani, esposti a questi valori per 8 ore al giorno e per 5 giorni alla settimana.

Esistono tre categorie o classi di TLV: (1) valore limite per tempi lunghi di esposizione (TLV-TWA: *Time Weighted Average*): concentrazione media ponderata nel tempo per 8 ore lavorative e 40 ore settimanali alla quale i lavoratori giorno dopo giorno possono essere esposti; (2) valore limite per tempi brevi di esposizione (TLV-STEL: *Short Term Exposure Limit*): concentrazioni tollerabili per agenti capaci di produrre effetti acuti (irritanti, narcotici ecc.), che sono definite quali valori medi per esposizioni di durata pari a 15 minuti, che non devono mai essere superati anche se la media sulle 8 ore resta contenuta entro il TLV-TWA; (3) valore limite per tempi brevissimi di esposizione (TLV-C: *Ceiling*, "tetto"): concentrazioni tollerabili per agenti capaci di produrre effetti acutissimi (potenti irritanti, tossici a effetto rapidamente mortale come l'acido cianidrico), che non devono essere mai superate.

In corso di sorveglianza sanitaria di soggetti professionalmente esposti a solventi industriali gli indicatori biologici hanno assunto importanza sempre maggiore e la valutazione dei risultati

ottenuti è uno specifico compito del medico competente. Nella attività routinaria di sorveglianza sanitaria vengono normalmente utilizzati i BEIs (*Biological Exposure Indices*) adottati e/o proposti dall'ACGIH, che rappresentano la concentrazione media di un solvente e/o di un metabolita presente nelle matrici biologiche di soggetti professionalmente esposti a un livello ambientale approssimativamente equivalente al TLV e che possono essere pertanto definiti limiti biologici equivalenti. Allo stesso modo, sempre più utilizzati in Europa risultano i valori limite biologici (*Biologischer Arbeitsstoff-Toleranz-Wert- BAT*) proposti dalla DFG e i BAL (*Biomonitoring Action Levels*) utilizzati dal FIOH oltre che, in Oriente, gli OEL-B (*Occupational Exposure Limits Based on Biological Monitoring*) proposti dalla JSOH.

E' evidente che il poter disporre di valori limite biologici stabiliti e/o proposti a livello internazionale facilita inevitabilmente un utilizzo crescente di questi parametri valutativi del rischio professionale, sebbene non debbano essere trascurate importanti problematiche relative alla presenza di fattori responsabili di variabilità, quali: 1) variabili fisiologiche (dieta, metabolismo, composizione dei liquidi corporei, età, gravidanza); 2) fattori occupazionali (carico di lavoro, esposizione cutanea, co-esposizione ad altre sostanze); 3) fattori non occupazionali (fumo di sigaretta, igiene personale, assunzione di alcol e farmaci, esposizione a prodotti chimici per hobbies, ecc.); 4) fattori metodologici (contaminazione dei campioni, bias nella scelta dei metodi analitici); 5) utilizzo dei dispositivi di protezione individuale.

CAPITOLO 2. BIOMARCATORI PER LA DIAGNOSI PRECOCE DEL TUMORE AL POLMONE

2.1 INTRODUZIONE

Il tumore al polmone è la prima causa di morte nei Paesi industrializzati rappresentando il 20% di tutte le neoplasie maligne (Ferlay *et al.*, 2013; De Angelis *et al.*, 2014).

Nei primi stadi della malattia, il tumore al polmone risulta in genere asintomatico, di conseguenza spesso viene diagnosticato troppo tardi, non riuscendo ad effettuare in modo efficace il trattamento. Inoltre, considerando che la sopravvivenza globale a 5 anni varia dal 10 al 15%, appare chiaro come i progressi nella diagnosi precoce siano fondamentali per consentire un intervento tempestivo per il riconoscimento di tale patologia (Vansteenkiste *et al.*, 2015)

Il cancro polmonare rappresenta una problematica complessa e attuale in ambito di salute pubblica anche perché l'aumento dell'età media della popolazione e la continua e crescente esposizione ai fattori di rischio ormai accertati, tra cui il fumo di sigaretta e l'inquinamento ambientale, non possono far altro che aumentarne l'incidenza anche nei prossimi anni (Albrand *et al.*, 2007).

L'unico approccio veramente efficace per modificare profondamente i *trend* di incidenza e di mortalità sembra essere rappresentato dall'attuazione di misure di prevenzione primaria, attraverso la riduzione dell'esposizione agli ormai ben noti fattori di rischio e la diagnosi precoce, tramite misure di prevenzione secondaria.

La diagnosi precoce, infatti, si prefigge lo scopo di identificare, nella popolazione dei soggetti a rischio, lesioni ancora alla stadio iniziale per le quali sia possibile attuare un trattamento terapeutico curativo e non demolitivo, in modo tale da bloccare la progressione della malattia migliorandone notevolmente la prognosi.

I test di *screening*, in generale, devono presentare alcune caratteristiche importanti, devono essere infatti semplici, non invasivi, efficaci, con un buon rapporto costi-benefici e con un

numero più basso possibile di falsi positivi, sia per rendere attendibile l'esame ma anche per le importanti conseguenze psicologiche che ciò può avere sugli individui sottoposti a tali prove. L'obiettivo dello *screening* oncologico è quindi quello di intervenire quando ancora sia possibile modificare la storia naturale della malattia.

2.1.2 Generalità del tumore del polmone

2.1.2.1 Epidemiologia

Ad oggi, il tumore al polmone rappresenta la neoplasia più frequente in entrambi i sessi e quella con maggiore mortalità nel sesso maschile. Nel 2008 sono stati stimati circa 1,61 milioni di nuovi casi, rappresentando il 12,7% di tutti i nuovi casi di cancro. Costituisce anche la più comune causa di morte per cancro con circa 1,38 milioni di morti (18,2% del totale), la maggior parte dei quali sarebbe prevenibile con adeguati interventi di sanità pubblica, soprattutto quelli mirati a contrastare la diffusione del consumo di tabacco.

Il rischio di avere una diagnosi di tumore polmonare nel corso della vita (fra 0 e 74 anni) è di 67,7% fra i maschi (1 caso ogni 15 uomini) e di 14,1% fra le femmine (1 caso ogni 71 donne), mentre il rischio di morire è di 56,4% fra i maschi e 10,4% fra le femmine.

L'incidenza e la mortalità del tumore al polmone variano a seconda del luogo geografico, dell'età, del genere, del gruppo etnico e della classe sociale. Per quanto riguarda la distribuzione geografica, la neoplasia è più diffusa nei Paesi sviluppati: in alcune popolazioni, come per esempio negli uomini afroamericani di diverse aree degli Stati Uniti, si verificano annualmente più di 100 casi ogni 100.000 abitanti, mentre in certe zone del mondo, come in Africa e in generale nelle Nazioni in via di sviluppo, il carcinoma polmonare è una malattia relativamente rara (GLOBOCAN 2008 IARC).

In Italia si stimano oltre 250.000 nuovi casi di tumore ogni anno nelle persone fino a 84 anni, e per tale malattia ogni anno muoiono 35.000 persone (di questi 27.000 circa sono uomini e 6.000

sono donne), rappresentando così la prima causa di morte oncologica nel sesso maschile e la seconda nel sesso femminile (www.istat.it).

2.1.2.2 Fattori di rischio

Il tumore al polmone ha una patogenesi multifattoriale ad insorgenza multifasica (Jemal *et al.*, 2011) e numerosi sono i fattori di rischio che possono contribuire all'insorgenza della malattia, tra questi possiamo annoverare il fumo di tabacco, il radon, l'amianto, l'esposizione professionale ad agenti cancerogeni, l'inquinamento atmosferico, la familiarità, le patologie polmonari pre-esistenti e predisponenti al cancro, la suscettibilità individuale, le anomalie genetiche, la dieta.

Il fumo di tabacco è responsabile della maggior parte dei casi di tumore al polmone ed è senza dubbio il fattore di rischio più importante finora evidenziato.

L'85% delle persone a cui viene diagnosticato un tumore al polmone è costituito da fumatori o ex-fumatori, dimostrando in questo modo, il ruolo di assoluto protagonista del fumo come fattore causale. La scoperta di tale correlazione tra fumo di sigaretta e cancro polmonare spetta a due illustri epidemiologi inglesi, Richard Peto e Richard Doll, che pubblicarono i primi studi negli anni cinquanta (Peto *et al.*, 2000).

Vi è una relazione diretta tra l'intensità dell'esposizione al fumo (determinata dal numero di sigarette giornaliere e dal numero di anni dell'abitudine tabagica) e il rischio di tumore polmonare (Hecht *et al.*, 2002). Il fumo di tabacco contiene più di 4.000 sostanze chimiche (di cui circa la metà si forma durante il processo di combustione) in grado di danneggiare irreparabilmente le cellule di molti organi. Alcune di queste sono dotate di marcate proprietà irritanti ed altre, circa una sessantina, sono sostanze sospettate o riconosciute cancerogene, cioè che causano il cancro, valutazione fatte in accordo con l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) (Hoffmann *et al.*, 2001).

Inoltre, all'esposizione al fumo passivo è stato associato un rischio di tumore polmonare tra il 20% ed il 30% per esposizione domestica, mentre all'esposizione in ambito lavorativo sono associati rischi tra il 16% ed il 19%. L'evidenza è sufficiente per classificare il fumo passivo come cancerogeno per l'uomo. Anche se i rischi sono modesti rispetto al fumo attivo, esso rappresenta comunque un notevole problema per la salute della popolazione per il gran numero di persone esposte.

Un altro fattore di rischio è rappresentato dal radon. Il radon è un gas radioattivo naturale, incolore e insapore, che si sprigiona dal suolo, caratterizzato da una grande inerzia chimica grazie alla quale si diffonde rapidamente negli ambienti liberandosi attraverso aperture o microfessure delle fondamenta, rimanendo intrappolato all'interno dell'edificio che ne limita la dispersione nell'atmosfera, aumentandone così la concentrazione (Bisset *et al.*, 2010). Fra i suoi isotopi, il Radon 222 è quello più pericoloso perché è presente in misura maggiore all'interno degli edifici e possiede maggiore attività radioattiva rispetto al suo progenitore insieme ad altri prodotti del decadimento. Si stima infatti che la sua presenza negli ambienti *indoor* causi circa 50 mila morti all'anno in tutto il mondo, più di mille solo in Italia. Recenti ricerche hanno promosso il radon la seconda causa di morte per tumore polmonare dopo il fumo di sigaretta (Catelinois *et al.*, 2006). È stato infatti stimato che l'esposizione al radon *indoor* sia responsabile dal 5 al 20% dei casi di tumore polmonare (Albini, 2009).

È stato dimostrato che anche l'amianto, un cancerogeno accertato, abbia un ruolo nell'insorgenza della neoplasia, infatti, il carcinoma polmonare è il tumore maligno più frequente negli individui esposti all'asbesto, in particolare quando associato al fumo (Hammond *et al.*, 1979). La consistenza fibrosa dell'amianto è alla base delle sue ottime proprietà tecnologiche, ma conferisce al materiale anche, purtroppo, delle proprietà di rischio essendo essa stessa causa di gravi patologie a carico prevalentemente dell'apparato respiratorio. La pericolosità consiste, infatti, nella capacità dei materiali di amianto di rilasciare fibre potenzialmente inalabili, le quali hanno la tendenza a suddividersi longitudinalmente in fibrille sempre più sottili con un diametro

sufficientemente fine (inferiore ai 3 micron) da essere respirate e poter penetrare profondamente negli alveoli polmonari.

Tutte le malattie da amianto insorgono a distanza di molto tempo dall'inizio dell'esposizione, in genere, dopo un periodo di latenza che dura 20 anni o più. Questo spiega perché gli effetti delle esposizioni avvenute nel passato si manifestano ancora oggi.

Per quanto riguarda il fattore di rischio inerente all'esposizione professionale è stato stimato che nel 2000 in tutto il mondo il 10% delle morti per tumore polmonare nei soggetti di sesso maschile (88.000 decessi) e il 5% nei soggetti di sesso femminile (14.300 decessi) era da attribuire all'esposizione professionale ad agenti cancerogeni polmonari (Fingerhut *et al.*, 2006).

Le Monografie della *International Agency for Research on Cancer* (IARC) rappresentano la fonte più completa scientificamente rilevante attualmente disponibile per la valutazione del rischio cancerogeno da composti chimici per l'uomo.

Risulta difficile fare una stima reale dei casi di tumore professionale e tale difficoltà è da attribuire a diversi fattori, in primo luogo al fatto che i tumori professionali non presentano caratteristiche istopatologiche diverse da quelle di una neoplasia spontanea nella stessa sede. Inoltre, l'eventuale eziologia professionale di neoplasie che insorgono in lavoratori attivi è più facilmente identificabile rispetto a quelle che insorgono in pensionati o in lavoratori dopo che hanno cambiato attività. Importante è anche da considerare il ruolo di altri fattori di rischio che possono avere un ruolo sinergico o additivo al rischio professionale (primo tra tutti è l'abitudine al fumo di sigarette); oltre al ruolo della suscettibilità individuale che può rendere un soggetto geneticamente più predisposto a un certo tipo di malattia.

L'inquinamento atmosferico, miscela eterogenea di composti gassosi, particolato e metalli pesanti, è considerato un fattore causale per il tumore del polmone e sarebbe responsabile del 5-7% dei tumori polmonari.

L'inquinamento ha cause naturali oppure generate dall'uomo (antropiche). Tra le emissioni naturali citiamo l'erosione eolica (fenomeno per il quale il vento sposta una massa d'aria da un

punto all'altro in base alla sua direzione e velocità), le attività vulcaniche (determinano la produzione di ossidi di zolfo, monossido di carbonio, particolato, benzene ed IPA) e gli incendi boschivi (produzione di CO, particolato, benzene ed IPA). Tra le fonti antropiche le cause possono essere attribuite al traffico autoveicolare, alla combustione e a processi industriali come la produzione di acido solforico (H₂SO₄), lavorazioni di materie plastiche, incenerimento di rifiuti, produzione di fertilizzanti azotati, impianti termici, centrali termoelettriche, impianti siderurgici e industrie petrolchimiche. Si ritiene che l'inquinamento atmosferico sia responsabile di circa il 3,6% dei casi di tumore al polmone nell'Unione Europea, in particolare le sostanze maggiormente responsabili sembrano essere le polveri sottili e gli ossidi di zolfo. Un altro recente studio invece attribuisce all'inquinamento ambientale il 5-7% dei casi di tumore polmonare in soggetti non fumatori o ex-fumatori, sempre facenti parte della Comunità Europea (Le *et al.*, 2010).

Un altro fattore di rischio implicato nell'insorgenza di tale malattia è la suscettibilità individuale, che entra in gioco nel predisporre geneticamente un soggetto ad ammalarsi di tumore. Alcuni degli oncogeni dominanti che sono spesso in causa nei tumori polmonari sono rappresentati da: *c-MYC*, *K-RAS*, *EGFR*, *c-MET* e *c-KIT*. Tra i geni oncosoppressori più comunemente deleti o inattivati ci sono *p53*, *Rb1*, *p16* e numerosi loci sul cromosoma 3p. Nel braccio di questo cromosoma vi sono numerosi geni oncosoppressori candidati, come *FHIT* di più recente scoperta (Li *et al.*, 2009). Recenti studi di associazione genetica hanno riscontrato un legame interessante con il polimorfismo nel gene del recettore nicotinico per l'acetilcolina, localizzato sul cromosoma 15q25 nel carcinoma polmonare sia nei fumatori che nei non fumatori (Hung *et al.*, 2008). Si dovrebbe ulteriormente sottolineare che il 25% dei casi di tumore polmonare in tutto il mondo colpisce i non fumatori che si differenziano a livello patogenetico. Molte di queste forme colpiscono comunemente le donne sotto forma di adenocarcinoma. Questi tendono ad avere mutazioni a carico del gene che codifica per *EGFR*, quasi mai mutazioni *K-RAS* e *p53*, le quali,

per quanto comuni, si verificano raramente. Anche la natura delle mutazioni sul gene oncosoppressore p53 è diversificata (Sun *et al.*, 2007).

Infine, è noto come anche le abitudini alimentari in certi casi possano rivestire un effetto protettivo nel rischio di sviluppo della malattia. Una dieta ricca di frutta e verdura fornisce all'organismo tutte le vitamine, le fibre ed i minerali di cui ha bisogno (Feskanich *et al.*, 2000). Secondo uno studio autorevole i fumatori tendono a consumare quantità di vitamina C inferiori rispetto ai non fumatori. Ad aggravare la situazione si aggiunge anche la riduzione dei livelli di vitamina C causata dal fumo indipendentemente dalle quantità assunte con la dieta. Per prevenire il tumore al polmone è dunque molto importante assumere le giuste dosi di vitamina C (almeno 60 mg/die, anche se per apprezzarne a pieno gli effetti antiossidanti si consigliano dosi superiori, nell'ordine dei 200 mg/die) (Miller *et al.*, 2004).

2.1.3 Patogenesi

Nella patogenesi del tumore del polmone si possono descrivere due fasi, la fase di iniziazione e la fase di promozione entrambe necessarie nel provocare il danno genetico e indurre la trasformazione neoplastica.

La fase di iniziazione è dovuta all'esposizione delle cellule ad una appropriata dose di agente cancerogeno (iniziante), che provoca un danno permanente e irreversibile al DNA. Questa fase da sola non è sufficiente alla formazione del tumore, è necessario infatti che agisca anche la fase di promozione. Le sostanze promuoventi possono indurre tumori in cellule iniziate, ma non sono di per sé cancerogene, infatti le modificazioni indotte in questa fase non agiscono direttamente sul DNA e sono reversibili. Sono però indispensabili a completare il processo di cancerogenesi in quanto le sostanze promuoventi rendono le cellule suscettibili a mutazioni aggiuntive causando proliferazione cellulare. Appare perciò evidente come il danno genetico sia condizione necessaria ma non sufficiente alla trasformazione neoplastica. Sebbene una sostanza iniziante possa provocare mutazioni come l'attivazione di oncogeni, in realtà essa può al massimo causare

una lesione preneoplastica o iperplastica. La successiva azione di una sostanza promuovente porta invece alla proliferazione ed espansione clonale della cellula iniziata e quindi mutata: il clone che deriva dalla cellula iniziata accumula ulteriori mutazioni, sviluppando alla fine un tumore maligno. Tra le sostanze ad attività iniziante fanno parte gli idrocarburi policiclici aromatici, che vengono prodotti dalla combustione del tabacco, altri cancerogeni legati specialmente all'esposizione occupazionale come l'asbesto, il cloruro di vinile, il nichel e il cromo esavalente. Invece, tra le sostanze promuoventi vanno annoverati farmaci, ormoni e fumo di sigaretta.

Un altro elemento indispensabile è l'angiogenesi, ovvero la formazione di nuovi vasi che garantiscono l'apporto ematico alla neoplasia ma che rappresentano anche l'accesso al sistema vascolare, via attraverso cui si verifica la disseminazione del tumore. L'angiogenesi costituisce quindi un elemento biologico necessariamente correlato allo stato di malignità (Pluda, 1997).

Lo stress ossidativo, causando l'ossidazione di macromolecole come DNA, lipidi e proteine, quindi, alterazioni strutturali e funzionali, è un meccanismo implicato nell'insorgenza e progressione tumorale (Klaunig *et al.*, 2004; Valko *et al.*, 2004).

Il fumo di tabacco, così come altri cancerogeni ambientali e professionali sono in grado di indurre stress ossidativo, determinando un'aumentata formazione di radicali liberi, in modo particolare le specie reattive dell'ossigeno. Queste specie reattive hanno molti effetti, ma tre reazioni risultano particolarmente importanti per il danno cellulare: 1) *danno ai lipidi di membrana*, mediante un meccanismo chiamato perossidazione lipidica che determina la formazione di perossidi, a loro volta instabili e reattivi, che innescano una reazione a catena autocatalitica che può dare origine a danno esteso a livello della membrana, degli organelli e della cellula, compromettendone l'integrità e la normale funzione (Miekisch *et al.*, 2004); 2) *danno alle proteine*, in cui i radicali liberi danneggiando profondamente la cellula (Stark, 2005); 3) *danno al DNA*, in cui i radicali liberi provocano una serie di lesioni al DNA e alle nucleoproteine, che se non riparate possono indurre modificazioni della trascrizione genica,

errori di replicazione e instabilità genomica, che sono tutti meccanismi implicati nella cancerogenesi (Franco *et al.*, 2008).

Da quanto detto si può ben capire come il carcinoma polmonare sia un processo multifasico caratterizzato dall'accumulo di numerose alterazioni genetiche, quali mutazioni di sequenza, perdita dell'eterozigosi (delezioni), amplificazioni geniche (Brambilla *et al.*, 2008). E' stato possibile identificare, attraverso metodiche di biologia cellulare e molecolare, le alterazioni geniche e le anomalie molecolari maggiormente coinvolte nel tumore del polmone (Panani *et al.*, 2006). Numerosi sono i geni implicati nel controllo del ciclo cellulare e nella trasduzione del segnale, e l'alterazione di alcuni di essi è associata con la prognosi dei tumori polmonari. L'elenco dei geni e delle molecole oggetto di studio è piuttosto esteso e comprende, fra le altre, p53, RB, cicline, chinasi ciclino dipendenti (cdk) ed i loro inibitori. Il più studiato è p53. Alterazioni di *p53* nei NSCLC sono state osservate nel 48% dei tumori con analisi di immunohistochimica e nel 40% con analisi molecolari. Vi è generale concordanza sulla maggiore frequenza delle alterazioni, rilevabili sia con metodiche immunohistochimiche che molecolari, nei carcinomi squamosi (54% e 49%) rispetto agli adenocarcinomi (36% e 29%). La quasi totalità dei microcitomi (80-90%) presenta alterazioni di *p53*. Da recenti meta-analisi è emersa una correlazione significativa fra alterazioni di *p53* e prognosi sfavorevole nei pazienti con adenocarcinoma polmonare, mentre tale relazione non è stata osservata nei pazienti con carcinoma a cellule squamose ed in quelli con microcitoma.

Un altro gene il cui ruolo è stato estesamente studiato nella patologia in esame è quello del retinoblastoma (*RB*). Nei NSCLC il gene *RB* è raramente alterato, mentre molto frequente è la sua mutazione o la perdita di espressione del suo prodotto di trascrizione nei SCLC e nei carcinomi neuroendocrini a grandi cellule. Nei NSCLC la perdita di espressione di *RB*, soprattutto se associata a sovraespressione di ciclina D1, sembra avere significato prognostico sfavorevole. Le cicline sono molecole di fondamentale importanza per la regolazione della progressione del ciclo cellulare, la cui funzione è quella di attivare specifiche chinasi dalle quali,

fra l'altro, dipende l'attivazione di RB. Varie cicline di fase G₁ (ciclina D1, ciclina E) e di fase G₂ (ciclina B1) sono state correlate con l'aggressività dei NSCLC del polmone. In particolare, la loro sovraespressione è stata generalmente associata a prognosi sfavorevole. Tale dato appare relativamente consistente per quanto attiene a ciclina E ed in parte contraddittorio per ciclina D1. L'associazione di sovraespressione di ciclina D1 con altri marcatori prognostici, quali RB e p16 (INK4), ne potenzia il significato prognostico (Singhal *et al.*, 2005).

Analogamente, notevole importanza nella patogenesi del cancro polmonare sembrano avere proteine interessate alla trasmissione intracellulare dei segnali, sia proteine transmembrana (EGFR, HER2), (Hynes *et al.*, 2009), sia molecole intracitoplasmatiche che funzionano da interruttori del segnale, in particolare K-ras. La maggior parte delle informazioni disponibili riguarda i carcinomi non a piccole cellule (NSCLC) in quanto per questi è più facile disporre di materiale biologico da analizzare (De Mello *et al.*, 2011).

2.1.4 Classificazione dei tumori polmonari

Risulta necessario trattare la classificazione dei tumori polmonari in quanto da questa discende il comportamento e la terapia degli stessi.

I tumori del polmone possono esser distinti in primitivi (se il tumore è d'origine polmonare) e secondari (se si tratta di metastasi di tumori a partenza da altri organi). I tumori primitivi sono, a loro volta, distinti in benigni e maligni. I tumori benigni sono rari (all'incirca il 6% delle neoplasie polmonari), mentre i maligni (costituiti essenzialmente dal carcinoma broncogeno) rappresentano la quasi totalità dei tumori polmonari primitivi. La classificazione che attualmente si utilizza è quella dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (Yesner, 1982) che suddivide tali neoplasie in 4 categorie principali: 1) *Carcinoma squamocellulare* (o epidermoidale); 2) *Adenocarcinoma*; 3) *Carcinoma anaplastico a piccole cellule*; 4) *Carcinoma anaplastico a grandi cellule*.

In base a criteri istopatologici, clinici e terapeutici si è soliti differenziare il carcinoma polmonare in due grandi categorie:

1. il microcitoma o carcinoma a piccole cellule (*Small Cell Lung Cancer*, SCLC) che rappresenta il 20% di tutte le neoplasie polmonari;
2. il carcinoma polmonare non a piccole cellule (*Non Small Cell Lung Cancer*, NSCLC) che comprende gli altri tre istotipi e rappresenta complessivamente il 75-80% di tutti i carcinomi polmonari.

Non solo il NSCLC rispetto al SCLC è la tipologia tumorale maggiormente diffusa, ma è anche quella che presenta i migliori risultati terapeutici e prognostici. Il SCLC rappresenta il tumore altamente aggressivo a rapida crescita e con diffusione metastatica precoce, e nonostante presenti un'alta sensibilità ai trattamenti radio e chemioterapici, la sopravvivenza media per le forme ancora localizzate è di 14-18 mesi e di 9-12 mesi per le forme estese, con un tasso a 5 anni del 3-8% dei casi.

Molteplici evidenze indicano che il NSCLC non si sviluppa “*ex abrupto*” da un evento trasformante dell'epitelio bronchiale o polmonare, ma trae origine da un processo a stadi multipli guidato dal progressivo accumulo di successive anomalie genetiche ed epigenetiche, che risulta in uno spettro di lesioni premaligne o preinvasive spesso multifocale (iperplasia a cellule basali, metaplasia squamosa, iperplasia adenomatosa atipica, displasia squamosa e carcinoma *in situ*) che si susseguono nel tempo, sia precedendo che accompagnando lo sviluppo dei tumori infiltranti secondo la teoria sequenziale dei cambiamenti progressivi morfologici e molecolari (Kerr, 2001). Queste lesioni sono spesso concomitanti, ma non necessariamente della stessa età ed hanno probabilmente differenti dinamiche di progressione neoplastica (Lantuejoul *et al.*, 2005).

2.1.5 Manifestazioni cliniche

Il principale motivo dell'alta mortalità del tumore polmonare risiede nel fatto che la sintomatologia di tale malattia è tardiva e sfumata e, quando compare, la malattia è già in fase avanzata. Di conseguenza soltanto il 15% dei casi di cancro del polmone viene scoperto in fase iniziale, quando, cioè, le possibilità di cura sono maggiori. L'esordio è multiforme e può essere caratterizzato da una sintomatologia variabile e non sempre strettamente correlata alla neoplasia. Questa dipende dal tipo istologico del tumore, dalle sue caratteristiche biologiche, dal suo tipo di crescita e dalla sua localizzazione.

In genere, i tumori squamocellulari ed i microcitomi sono centrali ed insorgono a carico dell'albero tracheo-bronchiale prossimale, per cui i sintomi di esordio più comuni sono la tosse, l'emoftoe, le broncopolmoniti recidivanti, la dispnea da occlusione bronchiale. Al contrario, gli adenocarcinomi, i carcinomi bronchioloalveolari e i tumori a grandi cellule sono in genere periferici e i sintomi sono ancora più tardivi e rappresentati dal dolore per l'infiltrazione della parete o dal versamento pleurico.

Schematicamente, i sintomi del tumore del polmone vengono classificati in sintomi legati direttamente alla presenza della massa neoplastica, polmonari ed extrapolmonari, in sintomi legati a sindromi paraneoplastiche associate alla neoplasia, e in sintomi dovuti alla presenza di localizzazioni secondarie.

2.1.6 Stadiazione e prognosi

La stadiazione della neoplasia permette di determinare l'estensione della malattia sia a livello toracico che extratoracico ed è un elemento fondamentale per definire il migliore trattamento terapeutico e valutare la prognosi.

La stadiazione del tumore polmonare viene effettuata utilizzando il sistema internazionale TNM (*Tumor Nodes Metastasis*), adottato dall'*Union Internationale Contre le Cancer* (UICC) e

dall'*American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, che consente una descrizione dell'estensione anatomica della neoplasia mediante la valutazione di tre parametri:

1- dimensioni del tumore primitivo (T);

2- coinvolgimento di linfonodi regionali (N);

3- presenza di metastasi a distanza (M) (Mountain , 1997; Mountain, 2000).

Questo sistema naturalmente è valido anche per altri tipi di neoplasie.

Possiamo effettuare una duplice stadiazione. Per quanto riguarda la stadiazione clinica (cTNM) essa è basata sulle informazioni ottenute dalle indagini diagnostiche e viene utilizzata per impostare il trattamento più opportuno. La stadiazione patologica (pTNM), invece, è basata sulle informazioni istopatologiche ottenute dall'esame istologico del campione a sua volta ottenuto con la resezione chirurgica fornendo una valutazione più accurata dell'estensione della malattia e le informazioni riguardo la radicalità dell'intervento chirurgico. Fornisce informazioni riguardanti l'eventuale coinvolgimento dei linfonodi loco-regionali, la classificazione istologica e il grado di differenziazione della neoplasia.

Attualmente è in vigore la Settima edizione della classificazione TNM, che aggiorna quelle precedenti e che comprende importanti revisioni delle regole di classificazione, approvate da tutti i Comitati nazionali TNM e in accordo con la Settima edizione del *AJCC Cancer Staging Manual* (2009), e che riguardano vari tipi di tumori, non solo quello polmonare (Lababede *et al.*, 2011). Sono state ridefinite le categorie T e M con un conseguente diverso criterio di assegnazione degli stadi (**Tabella 1**).

STADIO 0	Tis	N0	M0
STADIO I A	T1 a, b	N0	M0
STADIO I B	T2 a	N0	M0
STADIO II A	T2 b	N0	M0
	T1 a, b	N1	M0
	T2 a	N1	M0
STADIO II B	T2 b	N1	M0
	T3	N0	M0
STADIO III A	T1 a, b; T2 a, b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
STADIO III B	T4	N2	M0
	Ogni T	N3	M0
STADIO IV	Ogni T	Ogni N	M0

Tabella 1. Stadiazione TNM del tumore polmonare (Lababede *et al.*, 2011).

Il fattore T (tumore primitivo) è suddiviso in: 1) T1, tumore del diametro inferiore ai 3 cm circondato da parenchima polmonare o pleura viscerale con al massimo infiltrazione del bronco lobare; 2) T2, tumore del diametro superiore ai 3 cm ma inferiore ai 7 o tumore associato a infiltrazione del bronco principale, a infiltrazione della pleura viscerale e atelettasia o polmonite ostruttiva che dall'ilo si porta alla pleura viscerale senza però interessare l'intero parenchima; 3) T3, tumore di diametro inferiore ai 7cm o con invasione della parete toracica, diaframma, nervo frenico, pleura mediastinica, pericardio, bronco principale, atelettasia o polmonite ostruttiva dell'intero polmone omolaterale, lesioni tumorali multicentriche nello stesso lobo; 4) T4, tumore di qualsiasi diametro che presenti infiltrazione di mediastino, cuore, grossi vasi, trachea, nervo laringeo ricorrente, esofago, corpo vertebrale, carena e/o lesioni multicentriche in lobi diversi.

Per quanto riguarda il fattore N (linfonodi loco-regionali) è suddiviso in: 1) N0, assenza di metastasi linfonodali; 2) N1, metastasi linfonodali peribronchiali o ilari omolaterali o intrapolmonari incluso l'interessamento per continuità; 3) N2, metastasi linfonodali mediastiniche e/o sottocarenali; 4) N3, metastasi nei linfonodi mediastinici controlaterali, ilari

controlaterali, sopraclaveari o omolaterali o controlaterali a carico della catena del muscolo scaleno.

Per quanto riguarda il fattore M (metastasi a distanza) è suddiviso in: 1) M0, assenza di metastasi a distanza; 2) M1, metastasi a distanza.

Lo stadio riveste un ruolo di primaria importanza sia a scopo prognostico sia per la decisione della migliore scelta terapeutica.

2.1.7 Diagnosi

In caso di sospetto, su base anamnestica e clinica, di carcinoma polmonare l'*iter* diagnostico da seguire per avere conferma di ciò è l'esecuzione di una serie di esami strumentali che hanno lo scopo di dimostrare la presenza di una massa, discriminarla e quindi fare una diagnosi differenziale con noduli benigni, stadiarla per programmare il più appropriato approccio terapeutico e seguirla nel *follow-up*.

La radiografia del torace è l'esame strumentale storicamente utilizzato per formulare il primo sospetto diagnostico di tumore polmonare. La radiografia standard del torace deve essere eseguita in due proiezioni (Shaffer, 1997), postero-anteriore e latero-laterale. In tal modo è possibile avere una visione tridimensionale e localizzare una neoformazione in modo esatto, stabilendo anche a quale lobo polmonare tale neoformazione appartiene. Inoltre, la proiezione laterale permette di visualizzare lesioni che possono non essere rilevate con la sola proiezione antero-posteriore, quali piccole masse mediastiniche, noduli polmonari anteriori paramediastinici, lesioni localizzate dietro al cuore o al diaframma, lesioni della colonna vertebrale, piccoli versamenti pleurici.

In caso in cui permangano sospetti e si voglia confermare la presenza del nodulo, l'indagine migliore da eseguire è la tomografia assiale computerizzata (TAC), che è una procedura dotata di maggiore sensibilità e specificità; individua l'esatta localizzazione della massa, i rapporti con le altre strutture, esclude altre lesioni polmonari, e permette la caratterizzazione e diagnosi di natura

(Armstrong, 1994). Mediante questo esame si ottengono tante inquadrature dello stesso organo su piani successivi e da angolature diverse. Le immagini così prodotte sono inviate ad un computer che le elabora per dare poi il quadro dettagliato delle strutture interne dell'organo esaminato.

La risonanza magnetica nucleare o RMN è una metodica simile alla TAC, che sfrutta i campi magnetici, invece dei raggi X, per ottenere immagini dettagliate delle strutture interne del corpo. Talvolta la RMN si preferisce alla TAC, perché consente una migliore differenziazione dei tessuti, e nei casi in cui si voglia investigare una possibile infiltrazione della parete toracica e del diaframma (Bittner *et al.*, 1998), o in quei pazienti che non tollerano il mezzo di contrasto.

Un'ulteriore caratterizzazione della lesione è possibile tramite la tomografia ad emissione di positroni (PET), la quale usa una bassa dose di zucchero radioattivo per misurare l'attività delle cellule nelle diverse parti dell'organismo. Le lesioni neoplastiche di solito sono più attive del tessuto circostante e quindi assorbono più sostanza radioattiva, rendendosi in questo più evidenti. La PET serve per verificare se le cellule tumorali si sono diffuse al di fuori dei polmoni, oppure per esaminare eventuali masse residue dopo il trattamento e stabilire se sono semplice tessuto cicatriziale o se si tratta, invece, di cellule neoplastiche. E' dotata di una sensibilità del 95% e di una specificità dell'80%, risultando per questo l'indagine migliore per la stadiazione del tumore, è particolarmente accurata per lo studio del coinvolgimento dei linfonodi (parametro N della stadiazione TNM) (Coleman, 1999).

Una volta che i segni clinici, i sintomi soggettivi e gli accertamenti radiologici abbiano indicato la presenza di una neoplasia polmonare, è necessario arrivare a una diagnosi istologica che rappresenta la diagnosi di certezza (Shaham, 2000). Gli esami che si possono effettuare sono:

- **Esame citologico dell'espettorato.** E' l'esame più semplice e meno costoso, consistente nell'analisi citologica delle cellule dell'escreato del paziente. Il risultato dell'esame dipende dalla localizzazione e dalle dimensioni del tumore (Petty, 2000);

- **Broncoscopia.** E' un esame standard nella valutazione di un paziente affetto da neoplasia polmonare e costituisce l'approccio diagnostico fondamentale per la valutazione dei pazienti con un sospetto carcinoma broncogeno, essendo in grado di evidenziare eventuali lesioni neoplastiche a carico della mucosa (Lam *et al.*, 2000);
- **Agobiopsia transtoracica sotto guida TAC.** Consiste in una biopsia intraparenchimale effettuata con un ago sottile introdotto attraverso la parete toracica sotto guida TAC. È indicata nella diagnosi di neoplasie polmonari periferiche, non raggiungibili per via endoscopica;
- **Toracoscopia.** E' una metodica invasiva che permette di arrivare alla superficie polmonare con l'utilizzo di un toracoscopio inserito attraverso una piccola incisione della parete toracica (Mentzer *et al.*, 1997);
- **Mediastinoscopia.** Viene eseguita nel caso in cui la TAC abbia messo in luce linfonodi mediastinici di oltre un centimetro di diametro.

Gli accertamenti prevedono poi ulteriori valutazioni sia morfologiche sia funzionali atte a identificare eventuali metastasi e le capacità funzionali del soggetto, completando il quadro diagnostico.

2.1.7.1 Diagnosi precoce: il passato

Numerosi sono i tentativi e gli studi fatti fino a questo momento, ancora oggi però il ruolo dello *screening* per il tumore polmonare rimane una questione dibattuta.

Nel passato gli studi effettuati erano focalizzati sull'esecuzione di esami radiologici del torace come possibile strumento di diagnosi precoce. Nel 1950 furono effettuati 4 studi non randomizzati in cui facevano parte: “*Philadelphia Pulmonary Neoplasm Research Project*”, “*Veterans Administration Trial*”, “*Tokyo Metropolitan Government Study*” e “*South London Lung Cancer Study*”. I risultati di tale ricerche dimostrarono che lo *screening* basato sull'esecuzione dell'esame radiologico del torace andava a migliorare la sopravvivenza dei soggetti inclusi nello studio, attribuibile al riconoscimento precoce della lesione, ma non

mostrarono miglioramenti per quanto riguarda la mortalità, suggerendo che tale indagine non portava alcun beneficio.

Tra gli anni '50 e '70 furono effettuati altri due studi non randomizzati, sempre basati sulla radiografia del torace: “*The North London Cancer Study*” e “*The Erfurt Country Study*”. Anche i risultati di questi studi misero in evidenza il riscontro di un elevato numero di casi di tumore in stadi iniziali e non ci furono evidenze di riduzione di mortalità.

Stessi risultati per altri 4 progetti di ricerca che vennero sponsorizzati, attorno agli anni '70, dall'*U.S. National Cancer Institute*, comprendevano: “*The John Hopkins Lung Project*”, “*Memorial Sloan-Kettering Lung Project*”, “*Mayo Lung Project*” e “*Czechoslovakian Study*”.

Tali studi, che videro la partecipazione di più di 30.000 persone, furono condotti su soggetti di sesso maschile e forti fumatori che vennero sottoposti ad indagine radiologica del torace associata o meno all'analisi citologica dell'escreato per la ricerca di cellule neoplastiche, a seconda dello studio (Strauss, 2002). Le analisi dimostrarono un aumento dei casi di tumore scoperti in fase iniziale con un incremento del numero dei tumori ancora resecabili e miglioramento della sopravvivenza a 5 anni nei soggetti sottoposti a *screening*. Non vennero comunque registrate modificazioni significative nella mortalità. Probabilmente il fallimento di tali ricerche è da attribuire all'inadeguatezza delle tecniche di indagine utilizzate.

A seguito di tali osservazioni, apparve chiaro che gli studi di *screening* effettuati con queste metodiche diagnostiche avevano fallito, sia perché l'identificazione del tumore in fase iniziale non migliorava in maniera concreta la sopravvivenza sia perché la diagnosi precoce con queste tecniche non portava particolari benefici in termini di mortalità (Rossi A. *et al.*, 2005). Allo stato attuale si ritiene quindi di dubbia utilità l'esecuzione dell'esame radiologico del torace e dell'analisi citologica dell'escreato come programma di *screening* di *routine* (Manser *et al.*, 2004).

2.1.7.2 Diagnosi precoce: il presente

Più recentemente con l'avvento della TAC spirale e il notevole perfezionamento delle tecniche d'*imaging* si è riaperto l'interesse per l'istituzione di programmi di *screening* per il carcinoma polmonare. Risultati promettenti sono infatti stati ottenuti mediante l'utilizzo della TAC spirale a basso dosaggio (Henschke, 2000; Patz *et al.*, 2001). Tra i vantaggi di questa tecnica radiologica vi è la capacità di indagare con grande accuratezza il parenchima polmonare senza l'utilizzo del mezzo di contrasto, con tempi di scansione rapidi, meno di 15 secondi, esponendo il paziente a dosi limitate di radiazioni, oltre ai costi assimilabili a quelli dello *screening* mammografico. Inoltre, la TAC spirale è in grado di identificare lesioni allo stato iniziale con una frequenza 7 volte maggiore rispetto alla radiografia del torace, mostrando quindi una maggiore sensibilità.

Nel 1999 una ricerca chiamata ELCAP, *Early Lung Cancer Action Project*, reclutò 1.000 volontari, fumatori asintomatici di età superiore ai 60 anni, che furono sottoposti sia a TAC spirale sia a radiogramma *standard* del torace, in modo tale da confrontare le 2 indagini. La TAC spirale mise in evidenza neoplasie in stadio iniziale con una frequenza 6 volte maggiore rispetto all'utilizzo del semplice radiogramma (Henschke *et al.*, 1999).

Un altro studio, da parte della *Mayo Clinic*, reclutò 1.520 soggetti, di età superiore ai 50 anni, forti fumatori, vennero sottoposti anche all'esame citologico e all'analisi del DNA. Con la TAC multistrato vennero scoperti tumori allo stadio iniziale ma anche, con una elevata frequenza, noduli non calcificazione, sollevando importanti questioni riguardo la diagnosi differenziale, l'efficacia e i costi dello *screening* (Badwe, 2001; Fontana, 2000).

Nell'*International Early Lung Cancer Action Program* (Henschke *et al.*, 2006) vennero studiati 31.567 soggetti asintomatici esposti ad alto rischio sempre usando TAC a basse dosi; più di 27.000 ripeterono il test a distanza di circa 3 anni. Venne posta diagnosi di carcinoma polmonare in 484 casi e di questi l'85% era al primo stadio. Gli autori conclusero che tramite lo *screening*

annuale con TAC spirale su soggetti ad alto rischio era possibile fare diagnosi di tumore quando era ancora in uno stadio curabile, con una sopravvivenza a 10 anni di circa l'88%.

In un altro studio del 2007 vennero sottoposti a *screening* più di 3.000 individui, fumatori ed *ex* fumatori, tramite TAC annuale con un *follow up* mediano di 3.9 anni e si osservò che la probabilità di diagnosticare un tumore polmonare aumentava di 3 volte, che la probabilità di eseguire interventi chirurgici aumentava di 10 volte ma che il riconoscimento in fase avanzata ed i tassi di mortalità non subivano rilevanti modificazioni (Bach *et al.*, 2007).

A tutt'oggi la TAC spirale non sembra essere di valido e accertato ausilio come test di *screening*, nonostante permetta il riscontro di numerosi casi di lesioni polmonari in stadi iniziali e ancora curabili, in quanto non è in grado di ridurre significativamente i casi di diagnosi in fase avanzata e la mortalità. Inoltre, porta all'evidenza noduli polmonari spesso benigni, aumentando i casi di falsi positivi, che vengono indirizzati a interventi chirurgici inutili (Swensen *et al.*, 2005).

Recentemente, un progetto di ricerca sembra attribuire nuovamente alla TAC spirale una grande e significativa valenza diagnostica: nel Novembre del 2010, infatti, sono stati pubblicati gli importanti risultati dello studio Cosmos svolto in Italia presso l'Istituto Europeo di Oncologia (IEO), che confermano quelli dello studio del *National Cancer Institute* (NCI), basati sull'utilizzo della TAC spirale per la diagnosi precoce. Le due ricerche, quella italiana e quella americana, hanno stabilito come i pazienti sottoposti a TAC spirale hanno una mortalità inferiore del 20% rispetto a quelli sottoposti alla sola radiografia del torace. Inoltre, i dati finali dello studio Cosmos appaiono ancor più incoraggianti, prefigurando una riduzione di mortalità fino al 50%. Tale studio, iniziato nel 1999 e terminato alla fine del 2009, ha coinvolto 6.200 forti fumatori (un pacchetto di sigarette al giorno per 20 anni) di età superiore ai 50 anni o *ex* forti fumatori che hanno smesso di fumare da meno di dieci anni. Sono stati diagnosticati 297 carcinomi polmonari, nel 75% dei casi allo stadio iniziale, un tumore ogni 10 individui all'anno. Sono state eseguite 40.000 TAC spirale, un esame accurato, che dura 6 secondi e che espone a livelli di radiazioni ionizzanti inferiori al 70% della dose raccomandata per gli studi diagnostici

dalle normative europee e dalle leggi italiane. Con tale tecnologia i ricercatori sono in grado di individuare tumori di soli 0,6 mm, e sui volontari che rappresentano la popolazione a rischio sono stati riscontrati tumori ogni 12 persone in 10 anni (la percentuale è dello 0,8% all'anno). L'89% dei tumori scoperti è risultato asportabile chirurgicamente in modo radicale e nel 98% dei casi l'intervento è stato conservativo. La mortalità è stata inferiore dell'1% e il 33% dei pazienti è stato candidato alla chemioterapia.

Nel 2011, il *New England Journal of Medicine* ha pubblicato i risultati dello Studio Nazionale per lo *Screening* del Polmone (NLST), sponsorizzato dal *National Cancer Institute* negli Stati Uniti. Tale studio ha dimostrato che le morti per tumore polmonare sono diminuite del 20% e la mortalità complessiva è diminuita del 7% nei fumatori, definiti come fumatori correnti o ex fumatori, con consumo di almeno 30 pacchetti-anno, che avevano ricevuto regolarmente uno *screening* basato sulla tomografia computerizzata spirale (TAC) a bassa dose del torace, usando come controllo la radiografia toracica *standard*. Lo studio ha seguito più di 53.000 correnti fumatori ed ex fumatori fra i 55 e i 74 anni.

Anche se il NLST è il primo studio clinico randomizzato a mostrare un significativo calo dei decessi per tumore al polmone, esistono numerose possibilità per migliorare ulteriormente questo approccio. Vi è la necessità di introdurre misure di controllo di qualità per garantire la correttezza nella gestione dello *screening*. Ad esempio, il *follow-up* dei pazienti con noduli di natura indeterminata è estremamente importante e dovrebbe essere eseguito da un *team* di esperti nella valutazione di questi noduli, per assicurare una cura sicura ed efficace.

2.1.7.3 Approccio molecolare alla diagnosi precoce

L'approccio molecolare è complementare alle tecniche di diagnostica per immagini e ha lo scopo di aumentarne la specificità, in modo tale da contribuire a confermare o escludere la diagnosi, con metodiche poco o per nulla invasive (Mutti, 2008; Patz, 2006; Greenberg *et al.*, 2007).

Un importante campo di ricerca per l'individuazione di nuovi approcci per la diagnosi precoce si sta rivelando lo studio delle alterazioni molecolari presenti nelle cellule neoplastiche. Queste alterazioni possono infatti risultare validi bersagli per lo sviluppo di test diagnostici, basati su tecniche molecolari, in grado di individuare cellule maligne in fluidi biologici quali espettorati, lavaggi bronchiali, sangue, condensato dell'aria espirata, etc (Poli *et al.*, 2005; Mutti, 2008; Horvath *et al.*, 2009; Chan *et al.*, 2009).

I primi marcatori molecolari studiati per la diagnosi dei tumori del polmone sono state le mutazioni, come precedentemente descritto, a livello di alcuni oncogeni o geni oncosoppressori, o la presenza di alterazioni a livello di particolari sequenze genetiche, denominate microsatelliti (Andriani *et al.*, 2004; Destro *et al.*, 2004). Questi studi hanno fornito interessanti risultati soprattutto in termini di specificità e capacità di individuare lesioni precoci, ma hanno mostrato alcuni limiti soprattutto in termini di sensibilità. Infatti, se vengono prese in considerazione le alterazioni genetiche a carico di un singolo oncogene o di un gene oncosoppressore, essendo questi alterati solo in sottogruppi di tumori ed in percentuali quasi mai superiori al 50%, l'efficacia dei test diagnostici risulta scarsa.

Lo sviluppo, in questi ultimi anni, di nanotecnologie ad alta processività e la possibilità di correlare le alterazioni genomiche ed i profili genomici e proteomici dei tumori con numerosi parametri clinico-patologici, mediante innovativi metodi biostatistici, stanno fornendo nuovi ed importanti contributi per una più profonda comprensione del processo neoplastico.

I risultati finora ottenuti suggeriscono che l'impiego delle nuove nanotecnologie possa permettere di affrontare con successo complesse problematiche diagnostiche, aiutare a definire la prognosi dei pazienti e la responsività dei tumori ai trattamenti farmacologici.

In campo diagnostico, sin dai primi studi è emerso che l'analisi del profilo di espressione tumorale poteva permettere di classificare le neoplasie polmonari, in termini molecolari (Bhattacharjee *et al.*, 2001; Xi *et al.*, 2005). Più recentemente, è stato dimostrato che mediante la tecnica dei *microarrays* su cDNA è possibile distinguere profili di espressione appartenenti a

neoplasie istologicamente simili sviluppatasi in organi diversi come ad esempio, i carcinomi squamocellulari polmonari e i carcinomi squamocellulari insorti primariamente nel tratto testa-collo (Talbot *et al.*, 2005). Ciò potrebbe risultare utile per distinguere le neoplasie polmonari primitive da quelle metastatiche.

Per quanto concerne la valutazione prognostica, vari studi condotti con tecniche basate sui cDNA *microarrays* hanno permesso di identificare profili di espressione genica significativamente correlati con la prognosi, sia nell'ambito dei tumori polmonari in senso lato, sia, con dati più consistenti, nel contesto degli adenocarcinomi (Inamura *et al.*, 2005). Anche analisi genomiche basate su ibridazioni comparate (CGH, *comparative genomic hybridization*) e proteomiche effettuate tramite elettroforesi quantitativa bidimensionale su gel di poliacrilamide e spettrometria di massa hanno evidenziato associazioni tra alterazioni geniche o proteiche e l'evoluzione della patologia neoplastica polmonare (Shibata *et al.*, 2005; Seike *et al.*, 2005).

Strategie diagnostiche non invasive volte alla scoperta di biomarcatori precoci del tumore del polmone rappresentano oggi un approccio interessante e promettente per riuscire a identificare la neoplasia quando ancora è in uno stadio iniziale, e quindi trattabile.

L'importanza di arrivare a determinare metodiche poco o per nulla invasive è legata alla loro possibile applicazione nel campo della ricerca, nelle campagne di *screening* su vaste popolazioni e quindi devono risultare facilmente accettabili e riproducibili sia su soggetti che appartengono a categorie a rischio, per il riconoscimento precoce della malattia ma anche su soggetti sani, per scopi di studio.

2.1.8 Il condensato dell'aria esalata

2.1.8.1 Il condensato dell'aria esalata: nuova prospettiva

Gli eventi fisiopatologici che avvengono a livello polmonare sono tradizionalmente studiati attraverso tecniche a media e alta invasività, come la raccolta dello sputo indotto o la broncoscopia, con la raccolta del fluido bronco-alveolare (BAL) (Vatrella *et al.*, 2007).

Tuttavia la loro invasività rappresenta un limite per un uso di routine nella pratica clinica. Inoltre, la reazione infiammatoria che esse stesse inducono può avere un effetto significativo nella raccolta di campioni ripetuti nel tempo, riducendo notevolmente la loro applicabilità nel campo del monitoraggio biologico (Antczak *et al.*, 2005).

L'analisi dell'aria esalata ha fornito risultati interessanti nell'individuazione di nuovi biomarcatori i processi patofisiologici e infiammatori polmonari, sia utilizzando l'aria esalata in fase di vapore che condensando a basse temperature, ottenendo un condensato dell'aria esalata (CAE) (Corradi e Mutti, 2005; Kharitonov e Barnes, 2006).

Lo studio di questa matrice consente di ottenere informazioni sulla composizione del fluido di rivestimento delle vie aeree e permette di approfondire le conoscenze riguardo i meccanismi fisiopatologici polmonari attraverso la valutazione delle variazioni dei mediatori di flogosi e di stress ossidativo e permette di valutare gli indicatori ottenuti nel CAE come possibili biomarcatori esalati di patologie respiratorie (Horvath *et al.*, 2009). Inoltre, tale analisi ha il vantaggio che la raccolta dell'aria esalata in entrambe le fase (vapore-liquido) è estremamente facile da fare, non è invasiva, soprattutto per i soggetti con malattie polmonari, e permette la raccolta di campioni ripetuti nel tempo, non provocando fenomeni infiammatori secondari (Poli *et al.*, 2005).

Se da un lato l'aria esalata è stata utilizzata per la valutazione delle concentrazioni di composti organici volatili in soggetti esposti ad inquinanti ambientali (Amorim e De Cardeal, 2007;

Maniscalco *et al.*, 2006), il CAE è un fluido ancora relativamente poco studiato in campo ambientale ed occupazionale (Mutti & Corradi, 2006).

La tecnica di raccolta del CAE ha infatti il grosso vantaggio di essere totalmente non invasiva e di essere perfettamente tollerata senza disagi dai soggetti in esame (Corradi e Mutti, 2005).

Tra le molecole dosate con maggiore frequenza nel CAE ricordiamo il perossido d'idrogeno, alcuni prodotti della perossidazione lipidica (malondialdeide e sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico, TBARS), le prostaglandine, l'8-isoprostano, i leucotrieni e diverse citochine (Horvath *et al.*, 2005). Grazie alle sue caratteristiche, il CAE è particolarmente adatto allo studio della valutazione del rischio, dove la maggior parte degli studi vengono effettuati su pazienti asintomatici (Mutti & Corradi, 2006). In più, poiché le sostanze tossiche inalabili possono agire a livello locale sui polmoni, il CAE, che contiene molecole derivanti dalle vie aeree, può essere estremamente utile per caratterizzare la dose al bersaglio a livello polmonare, oltre che relazionare le concentrazioni di biomarcatori di esposizione locale e diversi biomarcatori di effetto (Mutti & Corradi, 2006). Questi ultimi, infatti, possono fornire un quadro di alcuni dei cambiamenti biochimici che interessano le vie aeree dopo esposizione acuta e/o cronica anche in assenza di sintomi o effetti sui parametri respiratori normalmente monitorati (FEV1 e FVC su tutti) (Horvath *et al.*, 2005).

In letteratura alcuni lavori hanno messo in evidenza alterazioni a carico di acidi nucleici, per esempio Zhang *et al.* identificano nel condensato dell'aria espirata mutazioni a carico dell'esone 19 di *EGFR* in un soggetto affetto da tumore al polmone (Zhang *et al.*, 2011), mentre Carpagnano *et al.* identificano mutazioni a carico del braccio lungo del cromosoma 19 nel DNA estratto da campioni di CAE di diversi soggetti affetti da tumore al polmone non a piccole cellule (Carpagnano *et al.*, 2010).

Ad oggi nessuna evidenza sperimentale ha dimostrato la presenza di miRNA nel condensato dell'aria espirata.

2.1.8.2 Il condensato dell'aria espirata: meccanismi di formazione

Il CAE è un fluido biologico che si ottiene per condensazione dell'aria esalata, quando questa, satura di vapore acqueo, viene raffreddata dal contatto con una superficie a temperatura inferiore. E' composto fondamentalmente da acqua, nella quale sono dissolte sostanze semi-volatili e non volatili. Se le sostanze volatili e semi-volatili sono esalate sottoforma di vapore a causa della loro relativamente alta pressione di vapore alla temperatura fisiologica, le sostanze non volatili presenti nel CAE, come i sali e le proteine, sono probabilmente esalate a causa di processi convettivi all'interno di piccole goccioline di "*lining fluid*" provenienti dalle vie aeree (Edwards *et al.*, 2004).

Da un punto di vista clinico il CAE può essere raccolto in modo semplice e non invasivo in soggetti d'ogni età affetti da ogni tipo di malattia, per cui è un fluido che è stato ampiamente usato negli ultimi anni per studiare le patologie polmonari (Mutti *et al.*, 2006) e diversi biomarcatori di infiammazione e stress ossidativo sono risultati aumentati rispetto ai controlli in malattie infiammatorie delle vie aeree (Rysz *et al.*, 2007; Tzortzaki *et al.*, 2007).

Tuttavia, l'utilizzo del CAE nella pratica clinica è ancora poco impiegata a causa di alcune limitazioni di tipo metodologico. In primo luogo, non è chiaro se sia o meno necessario trovare un fattore di normalizzazione che tenga conto della diluizione delle goccioline di "*lining fluid*" nel CAE (Goldoni *et al.*, 2005).

In un secondo luogo, manca ancora una standardizzazione nella raccolta e in commercio sono disponibili diversi sistemi con caratteristiche in parte diversi fra loro (Goldoni *et al.*, 2005; Soyer *et al.*, 2006).

Sono disponibili diverse strumentazioni per la raccolta di tale matrice (Prieto *et al.*, 2007). Negli ultimi anni è stato messo a punto un nuovo dispositivo denominato TURBO-DECCS (*Transportable Unit for Research on Biomarkers Obtained from Disposable Exhaled Condensate Collection System*, Medivac, Parma). Tale apparecchiatura ha il vantaggio di avere

dimensioni contenute e di essere perciò portatile, permettendo di effettuare la raccolta direttamente al letto del paziente o in azienda, nel caso si voglia effettuare il monitoraggio di esposizioni occupazionali. Inoltre è dotato di un termostato che permette di prefissare e mantenere la temperatura selezionata. La raccolta del CAE avviene facendo respirare il soggetto a volume corrente attraverso un sistema monouso, costituito da un boccaglio dotato di valvola unidirezionale connesso tramite un tubo in polietilene direttamente alla provetta in cui si forma il condensato, posta nel sistema refrigerante; in circa 15 minuti si raccolgono 2-3 ml di condensato (Figura 1).

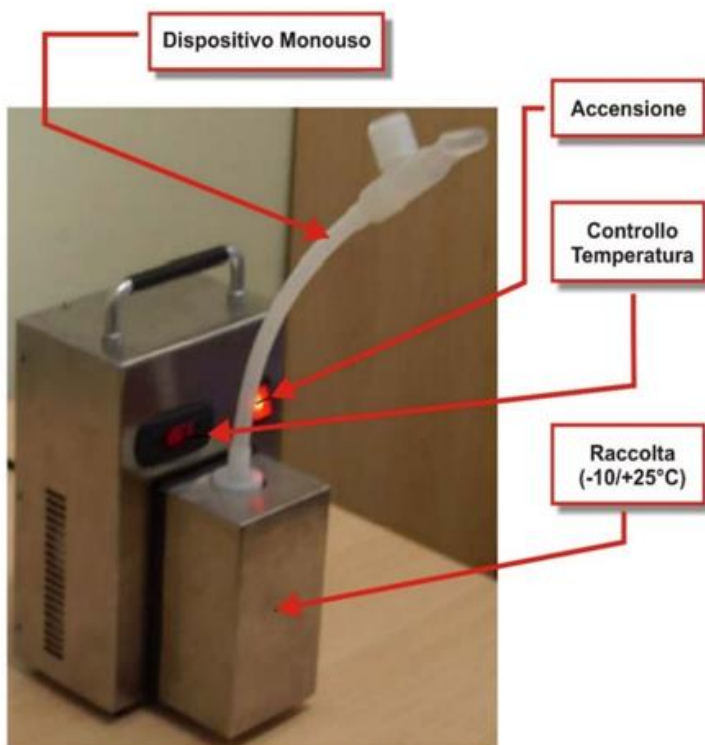


Figura 1. Dispositivo TURBO-DECCS per la raccolta del CAE.

Infine, per alcuni biomarcatori presenti in tracce nel CAE è necessario l'uso di tecniche di misura piuttosto sofisticate, a causa delle basse concentrazioni (Schettgen *et al.*, 2007), mentre su altri si discute ancora sulla variabilità e ripetibilità nelle misure (Goldoni *et al.*, 2005; Bloemen *et al.*, 2007).

2.1.9 Il plasma

Un'altra possibile matrice biologica che può essere utilizzata per l'identificazione di marcatori precoci è rappresentata dal plasma. È noto come spesso le patologie tumorali siano dovute a mutazioni genetiche e come l'analisi di queste mutazioni tumore-correlate venga frequentemente utilizzata a scopo diagnostico, prognostico e terapeutico. Il profilo genetico dei tumori solidi, che attualmente viene effettuato principalmente sui tessuti prelevati dal tumore stesso tramite biopsia o intervento chirurgico, spesso è difficile da ottenere. Queste procedure hanno alcune limitazioni: in primo luogo, a causa della loro invasività, non possono essere svolte routinariamente. Un secondo limite è rappresentato da un *bias* di selezione del campione: infatti, una biopsia fornisce una fotografia limitata del tumore, nel sito del prelievo e nel momento del prelievo, e potrebbe non contenere tutti i sub-cloni tumorali. Numerosi studi evidenziano come la quantificazione del DNA circolante, mutazioni a carico di oncogeni e geni oncosoppressori, modificazioni epigenetiche come la metilazione del DNA, la quantificazione di RNA e miRNA, il dosaggio di citochine e fattori di crescita coinvolti nella regolazione della proliferazione e della neoformazione di vasi sanguigni, possono essere determinati su un semplice prelievo di sangue e quindi in modo poco invasivo e possono essere utilizzati come possibili marcatori tumorali, da utilizzare nella diagnosi precoce (Pathak *et al.*, 2006; Paci *et al.*, 2009; Kaminska *et al.*, 2006). Inoltre, poiché le cellule tumorali apoptotiche o in necrosi liberano frammenti di DNA nel torrente ematico e questo DNA correla con lo stadio del tumore e con la prognosi, il plasma può rappresentare invece una fonte di DNA ottimale, in grado di offrire le medesime informazioni del DNA tissutale, comprendendo il profilo genetico sia della lesione primaria, sia delle metastasi. In un primo tempo questa tecnica è stata limitata dal fatto che il DNA circolante non fosse unicamente di origine tumorale e quindi l'identificazione di alleli tumorali fosse complessa: con il miglioramento della sensibilità e dell'accuratezza delle tecniche di

sequenziamento, anche le analisi del plasma hanno reso possibile l'individuazione delle aberrazioni genetiche ed epigenetiche (Diaz *et al.*, 2014).

Ulteriormente, il plasma offre un elevato grado di specificità: questo significa che è in grado di fornire dati robusti e riproducibili in modo semplice e non invasivo. Ciò è stato dimostrato anche da studi recenti sul carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) che hanno valutato lo stato mutazionale di EGFR, da cui emergono, nel confronto tra DNA circolante e DNA tissutale, una concordanza del 93,4%, una specificità del 99,8% e una sensibilità del 65,7% (Douillard *et al.*, 2014). Inoltre, questa matrice potrebbe essere utilizzata per una varietà di applicazioni cliniche e sperimentali precedentemente impossibili: il monitoraggio di una serie di genotipi tumorali, che sono instabili e, sotto pressione selettiva, soggetti a cambiamenti, sta diventando sempre più plausibile (Ilie *et al.*, 2014). Il plasma, inoltre, potrebbe fornire nuove intuizioni biologiche nel processo di metastasi e chiarire vie di segnalazione coinvolte nei processi di invasività cellulare e nella capacità di dare metastasi. Inoltre, può trovare grande utilità anche nella target therapy: consente per esempio il monitoraggio della presenza di cloni di resistenza ai farmaci, come nel caso della terapia anti-EGFR. Ulteriori potenziali applicazioni del plasma potrebbero essere lo screening precoce delle neoplasie maligne e la diagnosi della malattia minima residua. Infine, può divenire fondamentale come biomarker non invasivo per lo sviluppo di strategie di gestione del tumore personalizzate sul singolo paziente (Lebofsky *et al.*, 2015).

2.1.10 I microRNA

I microRNA (miRNA) sono una classe di piccoli RNA non codificanti, generalmente lunghi tra i 18-25 nucleotidi, in grado di regolare l'espressione genica a livello post-trascrizionale attraverso la degradazione di specifici RNA messaggeri (mRNA), o attraverso l'inibizione della traduzione in proteina (Hussain, 2012).

Le prime evidenze dell'esistenza dei miRNA risalgono al 1993 in seguito alla scoperta di un piccolo RNA non codificante di 22 nucleotidi, il lin-4, nel nematode *Caenorhabditis elegans*.

Tale miRNA appaiandosi alla regione 3' UTR dell'mRNA di LIN-14 ne inibiva l'espressione durante i primi stadi di sviluppo larvale (Bartel, 2004).

Successivamente furono identificati centinaia di miRNA, la maggior parte dei quali è stata clonata e sequenziata, ciò ha permesso di mettere in evidenza che molti miRNA sono conservati fra specie evolutivamente vicine, e molti hanno omologhi anche in specie più distanti.

Numerosi studi sperimentali hanno evidenziato come i miRNA agiscano in numerosi processi cellulari quali la proliferazione, l'apoptosi e il differenziamento, e in molti processi fisiologici come il metabolismo, la cancerogenesi e lo sviluppo del sistema immunitario. Inoltre, è stato dimostrato che i miRNA possono avere profili di espressione diversi in varie patologie, quali l'Alzheimer, l'obesità, il diabete, le patologie cardiovascolari, e soprattutto nel cancro.

I miRNA sono codificati da geni propri localizzati nel genoma. Generalmente circa il 70% dei geni per i miRNA si trovano in regioni intergeniche, mentre il 30% risiede in sequenze introniche di specifici geni.

2.1.10.1 miRNA e cancro

L'espressione dei miRNA è regolata spazialmente e temporalmente, e l'alterazione del quadro di espressione fisiologico di molti miRNA è associata a diversi esempi di tumori genesi umana; questa ipotesi ha portato a postulare che i miRNA possano essere considerati come una nuova classe di oncogeni o di oncosoppressori. Infatti molti processi biologici che convogliano i microRNA sono alterati nei tumori.

L'azione ad ampio spettro dei miRNA costituisce un nuovo ed altamente regolato livello di controllo dell'espressione genica, essenziale nella normale fisiologia cellulare.

E' stato dimostrato che esiste una relazione tra un profilo alterato di espressione di determinati miRNA e specifiche patologie quali l'Alzheimer, l'obesità, il diabete, le patologie cardiovascolari e soprattutto il cancro. Nello specifico, studi recenti hanno suggerito come incrementi o decrementi nell'espressione dei miRNA possano essere correlati alla regolazione di

oncogeni o soppressori tumorali e perciò spiegare una funzione importante nell'insorgenza di numerose forme tumorali. L'individuazione di differenti profili di espressione dei miRNA nel tessuto neoplastico rispetto alla sua controparte normale conferma l'ipotesi di un probabile coinvolgimento dei miRNA nello sviluppo e nella progressione tumorale.

Da numerosi studi di *profiling* su soggetti con patologie tumorali si è evidenziato come specifici set di miRNA siano associati al tessuto di origine o a determinate caratteristiche isto-patologiche e di aggressività del tumore (Yanaihara *et al.*, 2006).

E' stato inoltre dimostrato il ruolo dei miRNA non solo nelle fasi iniziali di sviluppo dei tumori primari, ma anche nelle fasi di progressione e metastatizzazione della malattia. Infatti, numerose evidenze sperimentali mostrano il coinvolgimento dei miRNA nella regolazione di processi biologici che portano all'acquisizione del potenziale metastatico, tra cui l'adesione, l'invasione, la migrazione, la transizione epiteliale-mesenchimale (EMT) e l'angiogenesi (Lages *et al.*, 2012). Molti studi su campioni provenienti da diversi tipi tumorali (polmone, mammella, stomaco, prostata, colon e pancreas) hanno portato all'individuazione di specifici miRNA in grado di accomunare tra loro differenti tumori. A conferma di ciò la variazione di espressione dei miRNA risulta spesso univoca tra i vari tipi di cancro, suggerendo un meccanismo comune di coinvolgimento dei miRNA nella tumorigenesi umana. Tali dati suggeriscono il forte coinvolgimento di tali molecole nella patogenesi dei tumori e supportano l'ipotesi di un possibile loro utilizzo come biomarcatori utili nella stratificazione dei pazienti sia in fase diagnostica che prognostica della malattia.

Recentemente è stata osservata la presenza dei miRNA nel plasma umano in diversi tipi tumorali quali colon, prostata, mammella, polmone ecc (Tsujiura *et al.*, 2010; Komatsu *et al.*, 2011; Cuk *et al.*, 2012).

Il rilascio di miRNA nello spazio extracellulare avviene per esocitosi mediata da microvescicole, non escludendo l'ipotesi di altre vie di rilascio, mediante ad esempio complessi ribonucleoproteici. A livello extracellulare i miRNA interagiscono con le cellule target attraverso

processi come la fusione diretta, l'internalizzazione e il legame ad un recettore (Simpson *et al.*, 2009).

I livelli dei miRNA nel plasma sono molto stabili. Infatti, i miRNA, che di per sé sono molecole in grado di resistere a cambiamenti di temperatura, quali quelli determinati da bollitura o congelamento, e a cambiamenti di pH, nel plasma risultano essere anche protetti dall'attività delle RNasi. Tali caratteristiche consentirebbero di utilizzare i miRNA come nuovi biomarcatori molecolari non invasivi nella diagnosi del cancro (Shen *et al.*, 2011).

Il primo studio che ha identificato miRNA circolanti nel siero è di Lawrie *et al.*, nel quale è stato evidenziato che specifici miRNA (miR-155, miR-21 e miR-210) erano over-espressi nei pazienti affetti da linfoma diffuso a grandi cellule B rispetto ai soggetti sani (Lawrie *et al.*, 2008).

Ulteriori ricerche hanno cercato di identificare specifici gruppi di miRNA nel plasma che potessero essere identificativi di una patologia neoplastica. Chen *et al.*, hanno indagato pazienti affetti da cancro colon-retto e da cancro al polmone, identificando profili di espressioni tipici per tipo di tumore, consentendo di tipizzare un tessuto neoplastico in modo più accurato di quanto non avvenga in base alle caratteristiche clinico patologiche o al quadro citologico (Chen *et al.*, 2007).

2.1.10.2 miRNA-21 e miRNA-486

Un significativo numero di geni dei microRNA sono localizzati in regioni genomiche frequentemente riarrangiate nei tumori, come siti fragili, regioni delete (*minimal region of loss of heterozygosity, LOH*) o amplificate (*minimal amplicons*) e regioni comuni di *break-point*, fornendo un'ulteriore evidenza del loro ruolo nella patogenesi del cancro. Alterazioni nei livelli di espressione dei miRNA sono state documentate in diversi tipi di cancro, e tra questi spesso si annoverano i miRNA che hanno come bersaglio geni regolatori dello sviluppo del cancro.

A seconda del tipo di funzione biologica del miRNA determinata dalle proteine che regola, si possono distinguere miRNA oncogeni o miRNA oncosoppressori. I primi si trovano in regioni

amplificate o sovraespresse nel tumore, e ciò determina un aumento della proliferazione cellulare, dell'angiogenesi, dell'invasività e una riduzione dell'apoptosi; i secondi si trovano in regioni delete o silenziate nel tumore e hanno un effetto biologico opposto.

In base a queste considerazioni in questo studio abbiamo scelto due miRNA implicati nello sviluppo del tumore al polmone con due ruoli diametralmente opposti: il miRNA-21, definito "oncomir" ed il miRNA-486 definito "mir-oncosoppressore".

Il miRNA-21 sembra giocare un ruolo chiave nel processo di cancerogenesi. Diversi studi hanno infatti dimostrato che tale miRNA è spesso sovraespresso in diverse patologie tra le quali il cancro (Jazbutyte & Thum, 2010)

Il miRNA-21, definito "oncomir", è codificato da un gene localizzato nel sito fragile FRA17B sul cromosoma 17p23.3 la cui funzione è quella di regolare importanti processi cellulari quali il differenziamento, la proliferazione e l'apoptosi. E' inoltre coinvolto in importanti processi implicati nello sviluppo tumorale quali l'invasione, l'infiltrazione e le metastasi, attraverso il controllo dell'espressione di geni quali TPM1 (*tropomyosin 1*), PDCD4 (*programmed cell death gene 4*), MTAP (*methyl-adenosine phosphatase*), ecc (Kumarswamy *et al.*, 2011)

La prima evidenza del ruolo di questo miRNA è stata fornita dalla forte sovraespressione riscontrata prima nel glioblastoma multiforme (Chan *et al.*, 2009) e poi nei tessuti di carcinoma alla mammella rispetto a quelli sani. L'inibizione del miRNA-21 mediante l'utilizzo di specifici oligonucleotidi antisenso in cellule di carcinoma mammario MCF-7 causa un aumento dell'apoptosi ed una riduzione della crescita cellulare; questo è in parte dovuto alla deregolazione dell'espressione di uno dei target del miRNA-21, il fattore antiapoptotico Bcl-2 (Si *et al.*, 2007).

Contemporaneamente un altro gruppo di ricerca ha dimostrato che nel medesimo ambiente cellulare, il miRNA-21 agisce ulteriormente andando ad inibire direttamente l'espressione della tropomiosina 1, il cui ruolo fisiologico è quello di ridurre la proliferazione cellulare (Zhu *et al.*, 2007). L'incremento di espressione di miRNA-21 è stata associata a molti altri tipi di tumori ed

allo stesso tempo sono stati identificati molti altri bersagli molecolari come ad esempio il noto oncosoppressore *PTEN*. Un importante studio ha individuato il gene oncosoppressore *PTEN* tra i bersagli molecolari di miRNA-21. Analisi *in vitro* mostrano come l'inibizione del miRNA-21 sia associata ad un'aumentata espressione di *PTEN* portando ad una diminuita proliferazione ed invasione delle cellule tumorali. L'inibizione del miRNA-21 induce inoltre un'alterata espressione delle metallo-proteinasi 2 e 9, entrambe mediatori a valle di *PTEN* con un noto ruolo nei processi di migrazione ed invasione cellulare (Pezzolesi *et al.*, 2008).

Tali dati suggeriscono che il miRNA-21 possa contribuire all'instaurarsi del fenotipo canceroso attraverso la modulazione di *pathway* coinvolti nella modulazione delle caratteristiche fenotipiche delle cellule cancerose, quali proliferazione, migrazione ed invasione.

Il miRNA-486 è invece definito un miRNA "oncosoppressore". E' localizzato sul cromosoma 8 in una regione frequentemente deleta in molti tipi di cancro. Studi sul miRNA-486 mettono in evidenza come la sua inattivazione sia necessaria per l'espressione di tratti pro-oncogenici. Quasi l'80% dei *targets* del miRNA-486 sono regolatori negativi della proliferazione cellulare o sono coinvolti nell'apoptosi. Ad esempio, ARHGAP5 regola negativamente le RHO GTPasi, famiglia di proteine che possono mediare le modifiche del citoscheletro, DOCK3 è un inibitore della via di Wnt/beta-catenina, CADM1 regola le proteine del citoscheletro attraverso l'attivazione di RAC, il quale può portare all'infiltrazione dei tessuti delle cellule leucemiche e Boeri *et al.* evidenziano nel plasma, di soggetti affetti da tumore al polmone, una diminuita espressione del miRNA-486 adducendo una implicazione di questo miRNA nella capacità di rinnovamento delle cellule bronco alveolari (Boeri *et al.*, 2011). In un esteso studio su tessuti malati e sani di 8 diversi tipi di tumori, tra cui il tumore al polmone, evidenziano come il miRNA-486 sia significativamente ipoespresso in tutti i tessuti malati rispetto a quelli sani in tutti i tumori considerati (Oh *et al.*, 2011).

2.2 OBIETTIVO DEL LAVORO

Il presente lavoro di tesi si pone l'obiettivo di identificare potenziali marcatori biologici da utilizzare nella diagnosi precoce del tumore polmonare.

Da quanto discusso dei paragrafi precedenti risulta fondamentale sviluppare metodiche poco o per nulla invasive in grado di individuare lesioni agli stadi iniziali, in modo da attuare un trattamento terapeutico fondamentale per bloccare la progressione della malattia e migliorare sia la prognosi che la qualità di vita dei pazienti. Risulta quindi fondamentale validare tecniche diagnostiche non invasive, di rapida esecuzione e affidabili, che siano in grado di individuare lesioni in uno stadio precoce.

Questo approccio da una parte potrebbe ridurre i casi di noduli falsi positivi che sempre più frequentemente vengono rilevati alla TAC spirale e che spesso richiedono interventi chirurgici inutili, dall'altra potrebbe essere utilizzato per esempio in ambito di sorveglianza sanitaria nei lavoratori esposti a sostanze cancerogene per il polmone nei quali appunto siano state rilevate lesioni sospette con indagini strumentali.

Scopo di questa tesi è quello di identificare alcuni possibili biomarcatori nel sangue e nel condensato dell'aria espirata, con lo scopo di ottenere un test diagnostico non invasivo con buona sensibilità e specificità. In particolare, la novità dello studio risiede nel fatto che i soggetti di controllo sono stati reclutati direttamente nei reparti dove venivano effettuate le indagini diagnostiche tradizionali (TAC, broncoscopia), in seguito alla presenza di sintomi polmonari o in presenza di noduli polmonari da seguire in *follow-up* ma con diagnosi negativa per il tumore polmonare, riducendo quindi gli errori legati all'utilizzo di soggetti di controllo reclutati tra la popolazione sana e tra i fumatori asintomatici. In particolare, sono stati valutati i miRNA. Nello specifico, in questo studio abbiamo studiato il miRNA-21, nel ruolo di oncomir, e il miRNA-486, nel ruolo di mir-oncosoppressore, valutando la loro espressione in diverse matrici, quali il plasma e il condensato dell'aria espirata, allo scopo di utilizzarli come indicatori precoci in

matrici periferiche, ovvero con metodiche non invasive, nella diagnosi di tumore al polmone non a piccole cellule.

In contemporanea i livelli dei miRNA analizzati, saranno valutati anche nei tessuti malati e sani dei soggetti con diagnosi certa di NSCLC operati per l'asportazione del tumore, per correlare l'andamento di tali marcatori sia nell'organo bersaglio (polmone) che nell'organo surrogato (plasma e CAE).

2.3 MATERIALI E METODI

2.3.1 Reclutamento dei pazienti

Sono stati reclutati 93 pazienti con NSCLC e 72 controlli presso diverse Unità Operative dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, nello specifico presso l'Unità Operativa di Pneumologia ed Endoscopia Toracica, l'Unità Operativa di Chirurgia Toracica e l'Unità Operativa di Scienze Radiologiche.

I dati anamnestici sono stati raccolti e inseriti in un database e per ogni singolo paziente sono stati registrati età, sesso, abitudine tabagica, patologie associate, stadio della malattia. I casi sono stati selezionati tra i pazienti che si sottoponevano a TAC o broncoscopia per approfondimenti diagnostici di sospette neoplasie polmonari, che poi si sono rivelate tali. I controlli sono stati reclutati tra i soggetti che si sottoponevano a indagini radiologiche per patologie respiratorie non neoplastiche o perché presentavano sintomi sospetti e sono stati selezionati per sesso, età e abitudini tabagiche in modo da risultare il più omogenei possibili rispetto ai casi. Le caratteristiche dei pazienti sono riassunte in Tabella 2.

Variabile	Controlli (N=72)	NSCLC (N=93)
Genere	45 F / 27 M	48 F / 45 M
Età	63,35 (SD: 11,55)	68,62 (SD: 7,95)
Fumo	23 non fum / 31 ex fum / 18 fum	14 non fum / 38 ex fum / 41 fum
Pack/years	30,75 (18,00-46,82)	44,00 (30,5-60,00)
Diagnosi	33 Noduli 12 Bronchiectasie 5 Enfisemi 22 Altro	52 ADK 25 SCC 16 altro
Stadio		27 IA 23 IB 2 IIA / 7 IIB 9 IIIA / 1 IIIB / 3 IV 21 ND
FEV1 (%PRED)	84 (SD: 22,26)	86 (SD: 24,18)
FVC (%PRED)	95 (SD: 20,74)	96 (SD: 18,38)

Tabella 2. Caratteristiche della popolazione in studio.

Legenda: ADK: adenocarcinoma; FEV1: *Forced Expiratory Volume in the 1st second*; SCC: carcinoma squamo cellulare; FVC: *Forced Vital Capacity*

L'esposizione a fumo di sigaretta è stata valutata mediante un questionario che è stato consegnato ai soggetti e che prendeva in considerazione sia il numero di sigarette fumate al giorno, sia il numero di anni di fumo e quindi la durata dell'abitudine tabagica. Come ex-fumatori erano considerati quei soggetti che avevano smesso di fumare da almeno un anno.

Il gruppo dei controlli era costituito da 45 femmine e 27 maschi, mentre i soggetti con tumore polmonare era costituito da 48 femmine e 45 maschi. L'età media dei due gruppi era invece sostanzialmente paragonabile, infatti il gruppo dei soggetti di controllo presentava un'età media di 63,35 anni, mentre il gruppo dei soggetti con neoplasia presentava un'età media di 68,62 anni. Inoltre, nel gruppo di pazienti con NSCLC la percentuale di non fumatori era più bassa rispetto ai controlli (15% dei casi contro il 31,9% dei controlli) mentre era più alta quella dei fumatori correnti (44,1% contro il 25% nei controlli), mentre la frequenza di ex-fumatori era confrontabile (40,9% contro 43,1% nei controlli). Per quanto riguarda i pacchi-anno (PY), considerando insieme gli ex-fumatori e i fumatori, i pazienti con NSCLC erano significativamente più alti rispetto ai controlli ($p < 0,0001$).

Il gruppo di controllo era costituito da 72 soggetti con anamnesi negativa per neoplasia polmonare, di questi il 45,9% presentava noduli riscontrati alla TAC, il 16,7% di soggetti presentava bronchiectasia polmonare, il 6,9% presentava segni di enfisema e il rimanente 30,5% altre patologie polmonari non neoplastiche. Nei pazienti con NSCLC, il 55,9% era affetto da adenocarcinoma (ADK), il 26,9% da carcinoma squamocellulare (SCC) e il 17,2% da altre forme. Inoltre, per quanto riguarda lo stadio, il 29% era nello stadio IA, il 24,7% nello stadio IB, il 9,7% nello stadio IIA-B e il 14% nello stadio IIIA-B/IV, mentre per il 22,6% dei soggetti lo stadio non era ancora definito. La stadiazione è stata effettuata tramite approfondimenti diagnostici che hanno permesso di valutare l'estensione della neoplasia e l'eventuale invasione a distanza e comprendevano l'esecuzione di TAC toraco-addominale ed ecografia addominale e, se indicato, anche TAC cerebrale e scintigrafia ossea, laddove vi era un sospetto coinvolgimento dell'encefalo o del sistema scheletrico. Inoltre, si è giunti alla definizione dell'istotipo del tumore

attraverso l'esame istologico. I soggetti reclutati sono stati adeguatamente informati sulla finalità dello studio e hanno firmato un consenso informato. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università di Parma e condotto in conformità con la Dichiarazione di Helsinki.

2.3.2 Raccolta del condensato dell'aria espirata

La raccolta del CAE è stata effettuata mediante un condensatore portatile (TURBO DECCS, MEDIVAC, Parma, Italia) alla temperatura di -5°C, chiedendo ai soggetti di respirare a volume corrente per circa 15 minuti attraverso un boccaglio monouso connesso al sistema di condensazione. I campioni sono stati conservati a -80°C fino all'esecuzione delle analisi.

2.3.3 Estrazione miRNA

I miRNA sono stati estratti con l'utilizzo di *kits* di estrazione diversi a seconda della matrice in esame.

2.3.3.1 Estrazione miRNA da tessuti

Piccole biopsie di tessuto polmonare in sede macroscopica di neoformazione tumorale e tessuto polmonare prelevato sullo stesso lobo ma in un'area apparentemente indenne di circa 0,5-1 cm³ sono state prelevate e poste in provette contenenti 1 ml di RNA *Later Reagent* (Ambion, *Life Technologies*, CA, USA), un preservante dell'RNA, e successivamente congelate a -80°C.

L'RNA totale è stato estratto dal tessuto polmonare biotico utilizzando il reagente TriZol (Ambion, *Life Technologies*, CA, USA), soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato, il cui protocollo si basa sulla metodica messa a punto da Chomczynski e Sacchi (Chomczynski e Sacchi 1987, *Anal.Biochem.* 162,156).

In breve 50-100 mg di tessuto polmonare per ciascun soggetto sono stati omogeneizzati in 1 ml di TriZol ed incubati 5 minuti a temperatura ambiente. A ciascun campione sono stati quindi aggiunti 0,2 ml di cloroformio (Carlo Erba Reagenti). Ciascun campione è stato successivamente

agitato vigorosamente per 15 secondi ed incubato a temperatura ambiente per 2-3 minuti. Le provette sono state centrifugate a 12000 g per 15 minuti a 4°C. Al termine della centrifugata, la fase acquosa sovrastante è stata prelevata, messa in una nuova provetta, a cui sono stati aggiunti 0,5 ml di isopropanolo (Carlo Erba Reagenti). I campioni sono stati incubati 10 minuti a temperatura ambiente e centrifugati a 12000 g per 10 minuti a 4°C. Il sovrinatante è stato quindi rimosso ed il *pellet* è stato lavato con etanolo al 75%, agitato e centrifugato a 7500 g x 5 minuti a 4°C. Il sovrinatante è stato quindi eliminato, il *pellet* lasciato ad asciugare per 10 minuti e risospeso in 80 µl di RNA *Storage Solution* (Ambion, *Life Technologies*, CA, USA), incubato 10 minuti a 60°C e successivamente congelato a -80°C.

2.3.3.2 Estrazione dei miRNA da plasma

Per l'estrazione dei miRNA dal plasma è stato utilizzato il *kit* commerciale mirVana PARIS *kit* (Ambion, *Life Technologies*, CA, USA). In breve a 500 µl di plasma è stato aggiunto un uguale volume di 2X *Denaturing Solution*. I campioni sono stati quindi incubati 5 minuti in ghiaccio. Al termine dell'incubazione un uguale volume di fenolo: cloroformio, è stato aggiunto a ciascun campione. Per miscelare bene i componenti le provette sono state agitate vigorosamente per 1 minuto e quindi centrifugate per 5 minuti a 10000 g per separare la fase organica dalla fase acquosa. Al termine della centrifugata, la fase acquosa sovrastante è stata prelevata, messa in una nuova provetta, a cui sono stati aggiunti 1,25 volumi di etanolo assoluto (Carlo Erba Reagenti). Successivamente la miscela etanolo/miRNA è stata applicata in una colonnina contenente un filtro specifico per intrappolare e trattenere i miRNA. Tale filtro è stato quindi più volte lavato con soluzioni di lavaggio specifiche per purificare i microRNA che al termine di tali procedure è stato eluito in 50 µl di *Elution Solution* preventivamente scaldato a 95°C. I miRNA così estratti sono stati quindi congelati a -80°C.

2.3.3.3 Estrazione dei miRNA dal condensato dell'aria espirata

Per l'estrazione dei miRNA dal plasma è stato utilizzato il *kit* commerciale *mirVana kit* (Ambion, *Life Technologies*, CA, USA). In breve a 500 µl di CAE sono stati aggiunti 300 µl di *Lysis/Binding Buffer*. A ciascun campione è stato aggiunto 1/10 del volume di *Homogenate Additive*, agitati ed incubati 10 minuti in ghiaccio. Al termine dell'incubazione un uguale volume di una miscela di fenolo: cloroformio, è stato aggiunto a ciascun campione. Per miscelare bene i componenti le provette sono state agitate vigorosamente per 1 minuto e quindi centrifugate per 5 minuti a 10000 g per separare la fase organica dalla fase acquosa. Al termine della centrifugata, la fase acquosa sovrastante è stata prelevata, messa in una nuova provetta, a cui sono stati aggiunti 1,25 volumi di etanolo assoluto (Carlo Erba Reagenti). Successivamente la miscela etanolo/microRNA è stata applicata su filtro specifico per intrappolare e trattenere nello specifico i microRNA. Tale filtro è stato quindi più volte lavato con soluzioni di lavaggio specifiche ed al termine di tali procedure eluito in 50 µl di *Elution Solution* preventivamente scaldato a 95°C. I miRNA così estratti sono stati congelati a -80°C.

2.3.4 Digestione miRNA con DNasi I

Una volta estratti i miRNA sono stati digeriti con DNasi I. Questo ulteriore passaggio è utilizzato allo scopo di eliminare l'eventuale contaminazione di DNA dal campione, che potrebbe portare successivamente ad amplificazioni aspecifiche. Tale digestione è stata condotta con l'utilizzo del *kit DNA-free* (Ambion, *Life Technologies*, CA, USA).

In breve a 30 µl per ciascun campione sono stati aggiunti 3 µl di 10x DNase I *Buffer*, 1 µl di rDNasi I (2 U/µl) e quindi incubati a 37°C per 30 minuti. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 0,1 volumi di DNase *Inactivation Reagent* a ciascun campione per inattivare l'enzima precedentemente aggiunto e per rimuovere i cationi divalenti, come magnesio e calcio, che potrebbero portare ad una degradazione dell'RNA. I campioni sono stati quindi incubati 2 minuti a temperatura ambiente e successivamente centrifugati a 10000 g per 1,5 minuti. Il sovranatante

è stato prelevato, posto in una nuova provetta e quantificato con spettrofotometro Nanodrop (*Thermo Scientific*, DE, USA), quindi congelato immediatamente a -80°C.

2.3.5 Retrotrascrizione dei miRNA

I miRNA estratti e digeriti sono stati quindi retrotrascritti con l'utilizzo del TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (*Life Technologies*, CA, USA) secondo istruzioni. In breve a 10 ng di RNA sono stati aggiunti 1 mM di dNTPs Mix (10nM di ciascun nucleotide: dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 1,5 µl di 10xRT Buffer, 0,25U di RNase Inhibitor, 50U di Multiscribe RT enzyme, 3 µl del primer specifico per il microRNA di interesse (TaqMan MicroRNA Assay *Life Technologies*, CA, USA) e H₂O per un volume finale di 15 µl. Il programma di retrotrascrizione prevedeva un ciclo di 30 minuti a 16°C, un ciclo di 30 minuti a 42°C ed un ciclo di 5 minuti a 85°C. Il cDNA così ottenuto era quindi diluito per la successiva reazione di quantificazione in *Real Time* PCR.

2.3.6 Preamplificazione per i miRNA estratti dal condensato dell'aria espirata

A causa della scarsità dell'RNA estratto da questa matrice, è stato necessario, per ottenere un buon risultato, preamplificare il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione. E' stato utilizzato a questo scopo il TaqMan PreAmp Master Mix Kit (*Life Technologies*, CA, USA). In breve 5 µl di cDNA sono stati miscelati con 0,2 µl di primers specifici per l'amplificazione dei retrotrascritti (TaqMan MicroRNA Assay, *Life Technologies*, CA, USA), 10 µl di TaqMan 2x Universal PCR Master Mix no AmpErase UNG (*Life Technologies*, CA, USA) e H₂O per un volume finale di 20 µl. Il programma di preamplificazione prevedeva un ciclo di 10 minuti a 95°C, seguito da 10 cicli, ciascuno dei quali costituito da uno *step* di 15 secondi a 95°C e uno *step* di 4 minuti a 60°C. L'amplificato così ottenuto era diluito 1:2 per la successiva reazione di quantificazione in *Real Time* PCR.

2.3.7 Quantificazione dei miRNA con sonde TaqMan

Le sonde TaqMan sono sonde ad ibridazione, specifiche per il frammento di interesse, marcate con molecole fluorescenti. Si tratta di oligonucleotidi che, come i *primers* della PCR, vengono disegnati per essere complementari alla sequenza bersaglio da amplificare. La sonda è disegnata in modo da ibridarsi all'interno del frammento amplificato nella reazione di PCR.

Il principio della reazione si basa sull'utilizzo di una sonda costituita da un oligonucleotide che contiene all'estremità 5' un marcatore fluorescente chiamato *reporter* e al 3' un *quencher* (un gruppo colorante in grado di mascherare l'emissione luminosa). Quando colpita dalla luce, la molecola fluorescente in 5' trasferisce energia al *quencher* il quale determina una inibizione della fluorescenza del substrato. Durante il processo di amplificazione, l'attività esonucleasica 5'-3' della Taq-polimerasi scalza la sonda determinando la separazione del *reporter* dal *quencher*, con una conseguente emissione di fluorescenza.

2.3.8 Quantificazione dei miRNA con tecnica di *Real Time PCR*

Le reazioni di PCR quantitativa in tempo reale, in duplicato per ciascun campione, sono state eseguite su termociclatore *iCycler iQ Real-Time Detection System* (BioRad, USA) con l'utilizzo dei *kit TaqMan MicroRNA Assay* (*Life Technologies*, CA, USA) specifici per ciascun miRNA.

La miscela di reazione per l'amplificazione era costituita da 1,33 µl di cDNA precedentemente diluito, 1 µl di *primers* specifici per ciascun microRNA, TaqMan 2X *Universal PCR Master Mix*, No AmpErase UNG (*Life Technologies*, CA, USA) ed H₂O per un volume finale di 20 µl. Il protocollo di amplificazione prevedeva un ciclo di denaturazione di 10 minuti a 95°C seguito da 40 cicli, ciascuno dei quali costituito da 2 *steps* di 20 secondi a 94°C e di 1 minuto a 60°C.

Per ogni reazione di amplificazione i campioni erano valutati in doppio e la validità della reazione era valutata attraverso un campione negativo, dove al posto del cDNA veniva aggiunta H₂O. La stima dell'espressione per i miRNA-21 e miRNA-486 è stata ottenuta dopo

normalizzazione rispetto ai miRNA di controllo con l'utilizzo del metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak *et al.*, 2001).

Per la normalizzazione dell'espressione dei miRNA in esame è stato utilizzato come housekeeping, per i tessuti il snoRNA RNU6B, mentre per il plasma e il CAE il miRNA-16.

2.3.9 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il *software* SPSS 16.0 per WindowTM. La distribuzione delle variabili è stata verificata col test di Kolmogorov Smirnov. A causa di significativi scostamenti dalla normalità per la maggior parte dei campioni sono stati utilizzati dei test non parametrici. Confronti fra due campioni indipendenti sono stati effettuati con il test di Mann-Whitney e le differenze fra due campioni dello stesso paziente sono state controllate con il test di Wilcoxon. L'analisi di correlazione è stata effettuata mediante test non parametrici (test di Spearman).

Per valutare il potere diagnostico delle singole variabili, sono state costruite curve ROC considerando il potere diagnostico complessivo, in cui è stata calcolata l'area sotto la curva (AUC) con l'intervallo di confidenza al 95%, ed è stato considerato significativo quando l'estremo inferiore di tale intervallo era $>0,5$, e il valore di *cut-off* con i conseguenti calcoli di sensibilità e specificità era il punto di flesso della curva ROC, comunemente calcolato considerando il punto in cui la somma di sensibilità e specificità è massima.

Per classificare i soggetti usando più variabili contemporaneamente, la variabile tumore sì/no è stata usata come *output* in un modello di regressione logistica binaria, utilizzando come predittori i singoli test diagnostici. In questo caso, nella curva ROC è stata utilizzata per ogni soggetto la probabilità di appartenenza ad uno dei due gruppi calcolata con il modello multivariato.

2.4 RISULTATI

2.4.1 Espressione del miRNA-21 e miRNA-486 nel tessuto

Il miRNA-21 e miRNA-486 sono stati quantificati nelle biopsie di tessuto tumorale e in biopsie di tessuto peritumorale adiacente. L'analisi statistica ha evidenziato differenze significative per entrambi i miRNA analizzati tra i due tessuti biopsici. In particolare l'espressione del miRNA-21 è risultata essere significativamente maggiore nel tessuto malato rispetto all'adiacente tessuto sano, con una $p=0,0007$ (**Figura 2**).

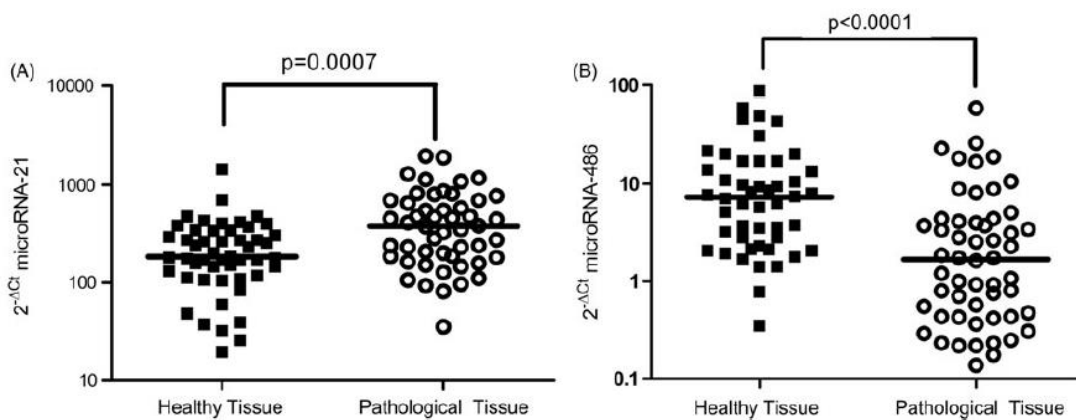


Figura 2. Quantificazione dei miRNA-21 e miRNA-486 nel tessuto malato e nel tessuto sano di soggetti affetti da tumore al polmone. È riportata la mediana (*range* interquartile).

Al contrario il miRNA-486 ha evidenziato valori significativamente maggiori nel tessuto sano rispetto al tessuto tumorale, con una significatività inferiore a 0,0001 ($p < 0,0001$) (**Figura 2**). Inoltre, abbiamo riscontrato anche una correlazione fra l'espressione del miRNA-21 nel CAE e l'espressione del miRNA-21 nel corrispettivo tessuto malato ($p=0.016$), sostenendo in tal modo l'ipotesi che il materiale genetico proveniente dal CAE è di origine cancerosa.

2.4.2 Espressione del miRNA-21 e miRNA-486 a livello del plasma

Valutando i soggetti non fumatori dai soggetti fumatori/ex fumatori, non abbiamo riscontrato nessuna differenza, di conseguenza queste variabili sono state escluse per ulteriori analisi. A differenza della variabile età, in cui i controlli erano in media più giovani dei soggetti con

NSCLC ($p=0.003$), e i controlli ex-fumatore/fumatore fumavano di meno ($p<0.001$) rendendo così l'età e i pacchetti-anno (P/Y) possibili fattori confondenti. Valutando i livelli del miRNA-486, si osservava una debole correlazione significativa con i P/Y ($r= -0.40$, $P<0.01$), e i livelli del miRNA-21 nel plasma correlavano con la variabile età ($r=0.36$, $p<0.01$).

Inoltre, l'analisi statistica ha evidenziato differenze significative per entrambi i miRNA analizzati tra le due popolazioni in studio. In particolare l'espressione del miRNA-21 è risultata essere significativamente maggiore nel plasma dei soggetti con NSCLC rispetto ai soggetti di controllo sani, con una $p<0,0001$. Al contrario l'espressione del miRNA-486 ha evidenziato una significativa riduzione di espressione nei soggetti affetti NSCLC rispetto ai soggetti sani, anche in questo caso con una $p<0,0001$ (**Figura 3**). Anche in questo caso vi erano delle correlazioni significative per le variabili età e P/Y (rispettivamente $p=0.008$ e $p=0.003$).

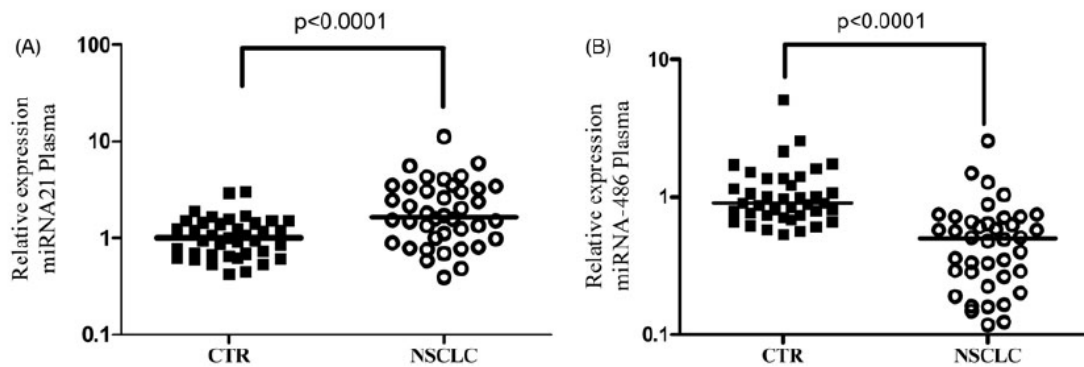


Figura 3. Quantificazione dei miRNA-21(A) e miRNA-486(B) nel plasma di soggetti affetti da tumore al polmone (NSCLC) e di soggetti sani di controllo (CTR). È riportata la mediana (*range* interquartile).

Per valutare il significato diagnostico di questi indicatori sono state costruite le rispettive curve ROC. Per quanto riguarda il miRNA-21, la curva ROC presentava un punto di flesso a 1,69 (sensibilità + specificità = max) con una sensibilità del 50% ed una specificità del 92,3%. L'area sotto la curva era di 0,740 (IC95 0,630-0,851), significativamente diversa da 0,5 (dato non mostrato).

Per quanto riguarda invece il miRNA-486 è stato possibile evidenziare una curva ROC in cui il punto di flesso a 0,35 (sensibilità + specificità = max) mostrava una sensibilità del 70% ed una specificità del 89,5%. L'area sotto la curva era di 0,857 (IC95 0,771-0,943), significativamente diversa da 0,5 (dato non mostrato).

Abbiamo calcolato anche il rapporto tra i due miRNA (miRNA-21/miRNA-486). In questo caso le correlazioni con l'età e i P/Y erano deboli ($r=0.37$, $p=0.001$ e $r=0.35$, $p=0.002$, rispettivamente). Per quanto riguarda il rapporto, i soggetti con diagnosi certa di NSCLC mostravano una maggiore iper-espressione del rapporto miRNA-21/miRNA-486 rispetto ai soggetti sani ($p<0,001$) (dato non mostrato).

In modo alquanto interessante la curva ROC generata dal rapporto tra il miRNA-21 e il miRNA-486 evidenziava un'elevata specificità e sensibilità. Nello specifico il punto di flesso era identificato al valore di espressione di 1,66 (sensibilità + specificità = max) e mostrava una sensibilità del 87% ed una specificità del 86.5%. L'area sotto la curva era di 0,901 (IC95 0,827-0,975), significativamente diversa da 0,5 (**Figura 4**).

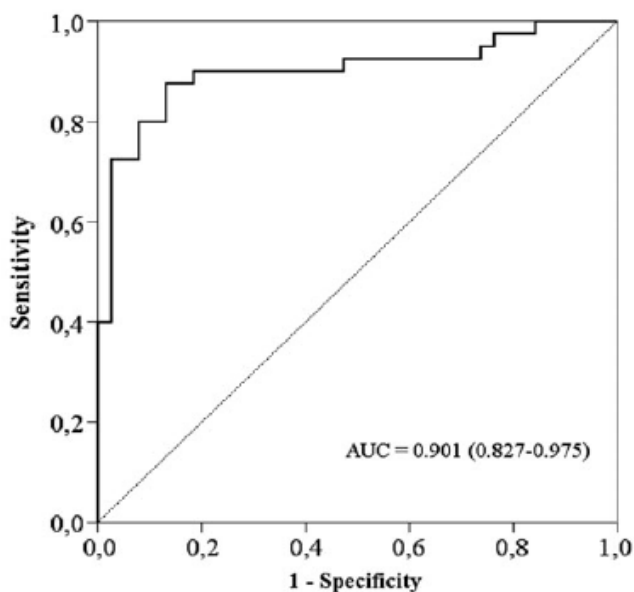


Figura 4. Curva ROC del rapporto miRNA21/miRNA-486 nel plasma.

2.4.3 Espressione del miRNA-21 e miRNA-486 a livello del condensato dell'aria espirata

La preamplificazione seguita dall'amplificazione dei miRNA nel condensato dell'aria espirata ha permesso di ottenere dei buoni risultati soprattutto in termini di riproducibilità. Per normalizzare i risultati dell'espressione dei miRNA nel CAE è stato utilizzato il miRNA-16 e questa scelta è stata confermata in seguito al controllo del ciclo soglia, che non erano significativamente differenti nei campioni di plasma e nei campioni di CAE nel gruppo dei controlli e il gruppo con NSCLC (figura 5).

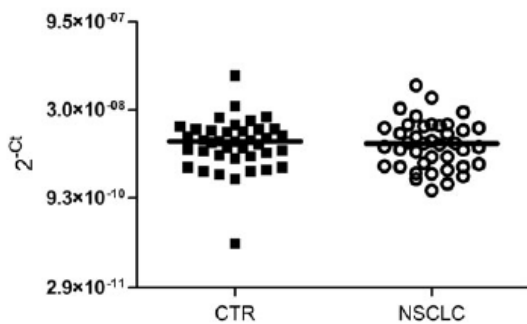


Figura 5. Espressione del miRNA-16 nel CAE nel gruppo dei controlli (CTR) e dei pazienti con NSCLC (NSCLC). Non vi sono delle significative differenze.

Inoltre, le concentrazioni degli RNA nel CAE erano di alcuni ordini di grandezza inferiori rispetto al plasma, per questo motivo i miRNA sono stati misurati in duplicato per ciascun soggetto e abbiamo calcolato le percentuali del coefficiente di variazione (%CV) inter-individuale. Il %CV del miRNA-16 era di 0.48% (range IQ: 0.25-0.88%) nel gruppo del controllo e di 0.72% (0.25-1.18%) nel gruppo dei pazienti con NSCLC; quelli per il miRNA-486 erano rispettivamente 0.67% (0.42-1.52 e per il miRNA-21 erano, rispettivamente, 0.25% (0.24-0.72) e 0.49 (0.24-0.95). La riproducibilità inter-giorno di entrambi i miRNA nel CAE (CAE raccolto per tre giorni consecutivi in un piccolo gruppo di controllo, n=6) era abbastanza scarsa (%CV >50%, dati non mostrati).

Nonostante queste piccole difficoltà, anche nel CAE, come nel plasma, l'espressione del miRNA-21 era maggiore nei soggetti affetti da NSCLC, rispetto ai soggetti sani ($p=0,0253$); al contrario il miRNA-486 mostrava una minore espressione nei soggetti malati rispetto ai sani ($p=0,0294$) (**Figura 6**).

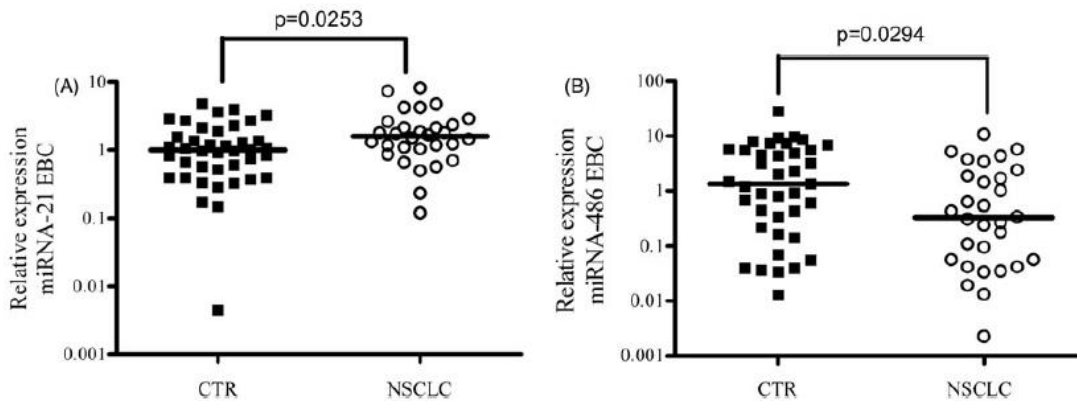


Figura 6. Quantificazione dei miRNA-21(A) e miRNA-486(B) nel CAE di soggetti affetti da tumore al polmone (NSCLC) e di soggetti sani (CTR) di controllo. È riportata la mediana (*range* interquartile).

Per valutare il significato diagnostico di questi indicatori sono state costruite le rispettive curve ROC. Per quanto riguarda il miRNA-21 nel CAE è stato quindi possibile evidenziare una curva ROC in cui il punto di flesso a 1,16 (sensibilità + specificità = max) mostrava una sensibilità del 70% ed una specificità del 62,5%. L'area sotto la curva era di 0,658 (IC95 0,528-0,787), significativamente diversa da 0,5 (dato non mostrato). Per quanto riguarda invece il miRNA-486 è stato possibile evidenziare una curva ROC in cui il punto di flesso a 0,346 (sensibilità + specificità = max) mostrava una sensibilità del 63,3% ed una specificità del 64,1%. L'area sotto la curva era di 0,654 (IC95 0,525-0,784), significativamente diversa da 0,5 (dato non mostrato). Abbiamo valutato successivamente il rapporto dei due miRNA, ma nel CAE i risultati erano statisticamente più deboli rispetto al plasma ($P=0.0288$ modello non corretto vs $p=0.12$ modello corretto) (**Figura 7**).

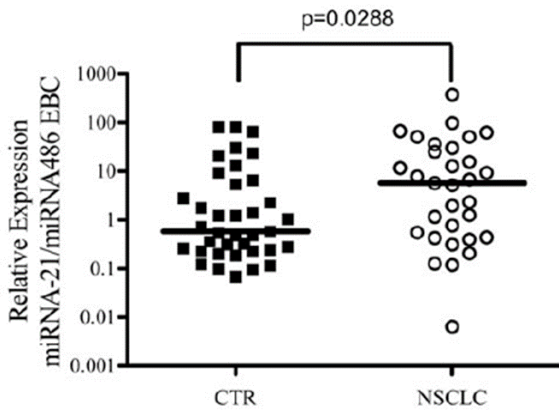


Figura 7. Rapporto miRNA-21/miRNA-486 nel CAE di soggetti affetti da tumore al polmone (NSCLC) e di soggetti sani (CTR) di controllo. È riportata la mediana (*range* interquartile).

Costruendo la corrispettiva curva ROC i risultati sono stati simili a quelli del miRNA-21 valutato da solo, con una sensibilità del 60% ed una specificità del 71,1%. L'area sotto la curva era di 0,672 (IC95 0,542-0,802), significativamente diversa da 0,5 (**Figura 8**).

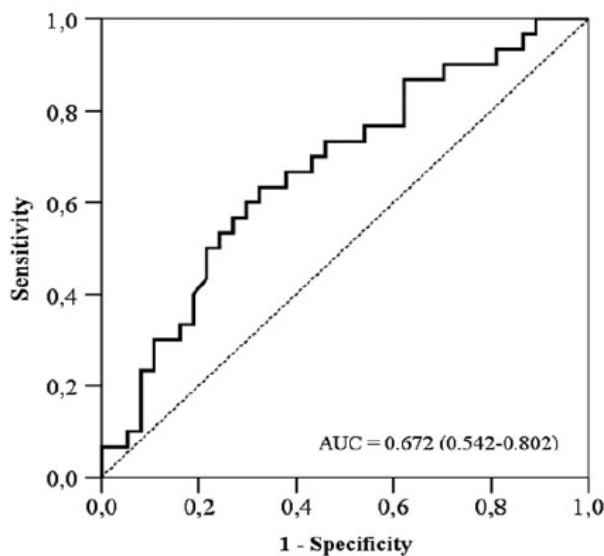


Figura 8. Curva ROC per il rapporto miRNA-21/miRNA-486 nel CAE.

Inoltre, osservando le relazioni tra i miRNA nei diversi fluidi biologici, abbiamo osservato che il miRNA-486 nel plasma correla in modo significativo, debolmente, con il miRNA-486 nel CAE ($r=0.41$, $p<0.01$) e la stessa correlazione tra plasma e CAE viene osservata anche per il miRNA-21 ($p= 0.08$) (dati non mostrati).

2.5 DISCUSSIONE

L'identificazione di biomarcatori tumorali che possano identificare la presenza/assenza della malattia utilizzando delle procedure diagnostiche non invasive rappresenta un aspetto fondamentale della ricerca sul cancro. Inoltre, svariati studi evidenziano una deregolazione dell'espressione dei miRNA nelle neoplasie umane, sottolineando il loro contributo nei processi di iniziazione e progressione tumorale. A tale riguardo, l'identificazione di miRNA cancro-specifici e dei loro bersagli molecolari rappresenta un passaggio chiave per caratterizzare il ruolo dei miRNA nella cancerogenesi umana e potrebbe essere importante anche per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici (Nikitina *et al.*, 2012).

In questo studio abbiamo indagato il ruolo di alcuni miRNA nel plasma e nel CAE come possibili biomarcatori da utilizzare per il tumore al polmone in pazienti con NSCLC e in un gruppo di soggetti con una diagnosi iniziale di sospetto cancro al polmone, identificato in base ai tradizionali test di diagnosi, ma con una diversa diagnosi finale.

Quantificando l'espressione dei due miRNA abbiamo ottenuto dei risultati con ruoli funzionali opposti dei due miRNA. Nel plasma l'espressione del miRNA-21 era significativamente più alta nei soggetti con NSCLC, mentre l'espressione del miRNA-486 risultava significativamente inferiore. Inoltre, nonostante le difficoltà analitiche, le concentrazioni dei due miRNA nel CAE hanno seguito la stessa tendenza del plasma. Inoltre, per avere un maggiore riscontro dei risultati, abbiamo quantificato l'espressione dei due miRNA anche nel tessuto patologico e nell'equivalente tessuto sano in soggetti che avevano subito un intervento chirurgico per NSCLC. I nostri risultati evidenziavano come l'espressione del miRNA-21 fosse maggiore nel tessuto malato, rispetto all'espressione del miRNA-486 che risultava decisamente inferiore nei tessuti patologici.

Diversi miRNA associati a tumori mostrano un'attività oncogenica, mentre altri, regolati negativamente nelle cellule neoplastiche, agiscono come soppressori tumorali. La deregolazione

d'espressione dei miRNA nei tumori può risultare da riarrangiamenti cromosomiali, come ad esempio la delezione che abroga l'espressione dei proapoptotici miRNA-15 e miRNA-16 in B-CLL (*B-Cell Lymphatic Leukemia*). Questi miRNA sono localizzati in una regione del cromosoma 13q14 che si trova deleta in circa la metà dei casi di CLL, e sono repressi in oltre due terzi dei casi di leucemia (Tang *et al.*, 2013). Altre volte l'espressione deregolata dei miRNA risulta dall'attività alterata di fattori trascrizionali oncogenici o oncosoppressori, come per esempio c-Myc, E2F1, p53 e NFkB (O'Donnell *et al.*, 2005; Diosdado *et al.*, 2009).

Come è possibile quindi ipotizzare lo scenario offerto dall'attività dei miRNA è alquanto vario e complesso soprattutto dovuto al fatto che queste molecole controllano più prodotti genici appartenenti a svariati *pathway*, comportando una eventuale deregolazione a cascata di eventi a valle con svariate implicazioni sulle funzioni cellulari. Proprio per limitare le possibili speculazioni a tale riguardo nel nostro studio abbiamo voluto valutare l'espressione solo di due miRNA, ma con ruoli diametralmente opposti quali il miRNA-21 considerato un oncomir ed il miRNA-486, considerato al contrario, un miRNA oncosoppressore.

Il coinvolgimento del miRNA-21 sembra essere in relazione a cambiamenti di espressione di diversi geni, implicati nello sviluppo del cancro. Uno studio di Liu *et al.*, evidenzia il ruolo fondamentale del miRNA-21 nell'angiogenesi tumorale attraverso l'attivazione di AKT e ERK1/2 che inducono l'espressione di HIF-1 α e VEGF (Liu *et al.*, 2010). Un'alta espressione di miRNA-21 associata ad una infausta prognosi è stata evidenziata in vari tipi tumorali, per esempio nell'adenocarcinoma al pancreas nello studio di Jamieson *et al.*, così come nell'adenocarcinoma al colon nello studio di Schetter *et al.*, o nel carcinoma renale dove era messa in evidenza una più bassa possibilità di sopravvivenza nei soggetti con alta espressione di miRNA-21 (Jamieson *et al.*, 2012; Schetter *et al.*, 2008; Zaman *et al.*, 2012).

Al contrario per il miRNA-486 è stata evidenziata una deregolazione opposta a quella del miRNA-21, con una maggiore espressione nelle matrici analizzate dei soggetti sani rispetto ai malati. Svariati studi hanno osservato una sua ipo-espressione in varie forme tumorali, tra cui il

tumore al polmone (Navon *et al.*, 2009). Inoltre, Jung, *et al.*, mostravano una maggiore espressione di diversi miRNA, tra i quali miRNA-21 nei tessuti malati di carcinoma orale rispetto ai rispettivi tessuti sani con l'unica eccezione del miRNA-486 che risultava l'unico ad essere ipo-espresso (Jung *et al.*, 2012). In un altro lavoro di Oh *et al.*, l'espressione del miRNA-486 risultava essere depressa sia in tessuti di tumore allo stomaco sia in linee cellulari di tumore gastrico. miRNA-486 sembra avere come potenziali bersagli molecolari diversi geni implicati nel processo di cancerogenesi, quali ad esempio TOB1, FBN1, HAT1, SP5 e OLM4 (Oh *et al.*, 2011).

Sulla base di questi presupposti nel nostro studio abbiamo voluto verificare la presenza di un'alterata espressione di questi due miRNA in diverse matrici. In tutte le matrici analizzate è stata messa in evidenza una maggiore espressione del miRNA-21 nei soggetti malati rispetto a quelli sani. Questo dato potrebbe indicare che l'aumento di questo miRNA è strettamente legato al processo di cancerogenesi e la sua elevata concentrazione potrebbe diventare altamente diagnostica e di grande utilità, soprattutto in quei pazienti nei quali le tecniche di *imaging* hanno evidenziato la presenza di noduli e che devono conseguentemente essere sottoposti a esami diagnostici più invasivi.

Per quanto riguarda il miRNA-486, in tutte le matrici analizzate sono stati riscontrati valori significativamente maggiori nei soggetti sani rispetto ai soggetti malati, portando quindi ad evidenziare un ruolo diagnostico importante anche per questo miRNA. Ruolo diagnostico che è stato successivamente confermato dalla buona sensibilità e specificità delle rispettive curve ROC.

Inoltre, visto che nella maggior parte dei casi i soggetti con un'elevata concentrazione di miRNA-21 presentavano una minore concentrazione di miRNA-486 e viceversa, effettuando il rapporto miRNA21/miRNA486, si otteneva una distinzione ancora maggiore fra soggetti sani e soggetti malati ottenendo un miglioramento in termini di significatività e sensibilità.

Inoltre, è importante notare che, se anche i tradizionali fattori di rischio, come l'esposizione a fumo di sigaretta e l'età, fossero diversi nei due gruppi, essi avevano però un debole influenza sull'espressione dei miRNA, indicando che il tumore al polmone svolge un ruolo attivo nella determinazione delle loro concentrazioni plasmatiche e confermando in questo modo il loro potere diagnostico.

Inoltre, abbiamo valutato l'espressione dei due miRNA anche nel CAE. Questa matrice è stata utilizzata in diversi studi clinici, per svariate sue caratteristiche, quali la semplicità di raccolta, in modo del tutto non invasivo, oltre al non causare nessun tipo di disagio nei pazienti di qualsiasi età o malattia. Inoltre, può essere utilizzato per effettuato anche misure ripetute e, nel corso degli ultimi anni, è stato introdotto nella pratica clinica (Malerba & Montuschi, 2012). Oltre a questi vantaggi, il CAE rappresenta un potenziale surrogato per la diagnosi del tumore al polmone in quanto esso contiene il materiale proveniente dai polmoni e del tratto respiratorio inferiore. I risultati che abbiamo ottenuti, mostravano come l'espressione del miRNA-21 fosse decisamente maggiore nei soggetti con NSCLC rispetto alle concentrazioni del miRNA-486 che risultavano minori, risultati simili quindi al plasma, ma meno incoraggianti a causa di una scarsa riproducibilità dei risultati (il %CV della riproducibilità dei livelli di miRNA inter-giorno era sempre >50%). Nonostante questa variabilità, il CAE rappresenta un ottimo surrogato del tessuto polmonare, quindi sono necessarie ulteriori procedure per migliorare il campionamento al fine di aumentare la resa di rivelabilità del materiale genetico (come mostrata la difficoltà, in questo studio, nel quantificare i miRNA). Attualmente stiamo sviluppando un sistema di raccolta diretto del CAE su filtri di RNA nel tentativo di intrappolare direttamente i miRNA e ridurre in questo modo anche la variabilità inter- e intra-individuale. Tuttavia, nonostante la difficoltà di quantificare nel CAE i biomarcatori in studio, i due miRNA erano in grado di distinguere i due gruppi in studio. Nel modello di regressione logistica utilizzato per stimare la capacità dei miRNA nel CAE di distinguere i due gruppi abbiamo ottenuto una percentuale del 81.1% per i controlli (opportunamente classificati 30/37), una percentuale del 53.1% nel gruppo di NSCLC

(opportunamente classificati 16/37) e una percentuale globale del 68.7%. Inoltre, se questi risultati venissero confermati su un numero maggiore di soggetti, l'identificazione di questi nuovi indicatori di diagnosi di tumore al polmone nel CAE potrebbero affiancare e migliorare la sensibilità e la specificità delle tradizionali procedure radiologiche di *screening*.

Da questi dati è quindi possibile dedurre che l'espressione aberrante anche di un ristretto pannello di miRNA, in questo caso due, caratterizzata nelle diverse matrici studiate, è in grado di predire con una buona accuratezza la natura del campione analizzato. Inoltre considerando il fatto che la maggior parte dei soggetti con tumore al polmone presentavano un tumore nei primi stadi di malattia è ragionevole pensare che questi due miRNA possano partecipare agli eventi molecolari che portano allo sviluppo del tumore al polmone, già nelle prime fasi della malattia.

Diverse evidenze sperimentali hanno messo in luce la possibilità di utilizzare matrici del surrogato dell'organo bersaglio per una diagnosi non invasiva di malattia il più delle volte però fallendo nel risultato. In modo interessante tale andamento è stato messo in evidenza per la prima volta nel CAE, questo permetterebbe, in affiancamento alle tecniche di *imaging*, di diagnosticare la malattia anche nelle fasi precoci, portando ad un abbattimento di falsi positivi visto il buon potere discriminante di questi due miRNA tra tumori e noduli polmonari con una metodica totalmente non invasiva.

Oltre al suddetto ruolo diagnostico, il riscontro di determinati miRNA nei soggetti affetti da patologie tumorali potrebbe portare buoni risultati, anche nella terapia oncologica. Infatti uno dei più importanti fattori che influisce sulla probabilità di sopravvivenza di pazienti, con neoplasia a carico del polmone, è la resistenza ai trattamenti.

In particolare, la stratificazione tumorale sulla base dei livelli di espressione di determinati miRNA potrebbe essere uno strumento prognostico utile per predire la resistenza o la sensibilità al trattamento con farmaci antitumorali.

In aggiunta, l'utilizzo di miRNA come innovativo trattamento terapeutico, potrebbe non solo sensibilizzare le cellule tumorali all'apoptosi farmaco-indotta (Hassan *et al.*, 2012), ma anche

inibirne la sopravvivenza, la proliferazione e la capacità invasiva. Si potrebbe ipotizzare quindi l'uso dei miRNA come nuovi target terapeutici in associazione con i tradizionali trattamenti anti-tumorali.

Alla luce del complesso scenario in cui sono coinvolti i miRNA, sarà necessario un ulteriore sforzo al fine di elucidare e caratterizzare il potenziale oncogenico od oncosoppressore di ciascun miRNA. I dati ad oggi disponibili chiaramente supportano il ruolo dei miRNA nell'eziologia del cancro e suggeriscono un possibile impiego di queste molecole come marcatori diagnostici e prognostici e come nuovi *target* o strumenti terapeutici.

2.6 CONCLUSIONI

Alla luce delle considerazioni fatte, dei vari lavori analizzati in bibliografia, e dei risultati da noi ottenuti nel suddetto studio, possiamo mettere in evidenza come, nuovi biomarcatori quali i miRNA, possano avere un ruolo diagnostico fondamentale in diverse matrici di facile accesso, quali il plasma e per la prima volta il condensato dell'aria espirata. Si potrebbe quindi pensare ad un loro ipotetico utilizzo a fianco delle tradizionali tecniche di *imaging* a scopo diagnostico.

In modo sorprendente il condensato dell'aria espirata, che rappresenta il surrogato più specifico del polmone, ha evidenziato lo stesso andamento dei tessuti e del plasma per i biomarcatori analizzati, miRNA-21 e miRNA-486. Questo risultato è molto importante in quanto permetterebbe di diagnosticare la malattia senza l'utilizzo di esami strumentali invasivi, che arrecano notevoli disagi e sofferenze al paziente che li subisce.

Ulteriori studi saranno necessari per confermare tali evidenze sperimentali, in modo particolare sarà necessario aumentare il numero dei soggetti in studio per confermare le differenze evidenziate. Inoltre sarà necessario, eventualmente, ampliare anche il numero di biomarcatori da utilizzare nella diagnosi del NSCLC, per costruire un *pattern* di indicatori sensibili e specifici. Inoltre, studi di *follow up* sugli stessi pazienti potrebbero consolidare anche un ruolo prognostico di tali biomarcatori nella patologia in esame.

CAPITOLO 3. BIOMARCATORI URINARI DI ESPOSIZIONE E DANNO OSSIDATIVO NEI BAMBINI ESPOSTI A BASSE CONCENTRAZIONI DI BENZENE

3.1 INTRODUZIONE

L'inquinamento atmosferico, oltre a rappresentare un aspetto di lenta ma costante aggressione alla biosfera, può dar luogo a fenomeni acuti di notevole gravità, provocando disagi al normale svolgimento delle attività di lavoro e problemi della salute pubblica. Ulteriormente, tra i maggiori inquinanti ambientali di natura antropica, il benzene suscita un elevato interesse tossicologico. La consistente presenza di questo componente nelle benzine ed il suo conseguente rilascio nell'ambiente, direttamente per fenomeni evaporativi legati al ciclo di produzione dei carburanti, o indirettamente per l'emissione dei gas di scarico dai veicoli a motore, ha reso ubiquitaria la presenza di questo tossico nell'aria che respiriamo quotidianamente. I livelli di benzene nell'aria variano tra 0.1 e 17 ppb nelle regioni non industrializzate, ma crescono fino ad essere comprese tra 0.01 e 0.09 ppm nelle grandi città (Tomei *et al.*,2001).

Il benzene si presenta come un liquido chiaro, trasparente, molto volatile ed infiammabile, con un odore aromatico caratteristico la cui soglia di percezione olfattiva è di 5mg/m³ (1 ppm= 3,25 mg/m³) (IARC, 2012). Il D.Lgs 81/08 nell'allegato XLIII riporta 1 ppm (pari a 3,25 mg/m³) come valore limite di esposizione professionale a benzene calcolato in relazione ad un periodo di riferimento di 8 ore lavorative (D.Lgs. 9 Aprile 2008 e s.m.i. La sicurezza e la salute nei luoghi di lavoro), mentre per l'ACGIH (Conferenza Americana Degli Igienisti Industriali) il TLV-TWA è di 0,5 ppm (1,6 mg/m³) e il TLV-STEL è di 2,5 ppm (8 mg/m³) (ACGIH, 2004). E' classificato come sicuramente cancerogeno per l'uomo sia nell'elenco svizzero dei valori limite (sostanza C1), sia dalla IARC (*International Agency for Research on Cancer* dell'OMS) che lo ha inserito nel gruppo 1.

La sua elevata infiammabilità lo rende particolarmente pericoloso e l'elevata evaporazione è invece primariamente responsabile dei fenomeni di avvelenamento che, ad elevate concentrazioni, possono portare fino alla morte per paralisi del sistema respiratorio e successiva asfissia. Ad oggi, il benzene è ottenuto dalla distillazione del petrolio, la maggior parte (85%) trova impiego nella chimica come materia prima per numerosi composti secondari, a loro volta utilizzati per produrre plastiche, resine, detergenti, pesticidi, intermedi per l'industria farmaceutica, vernici, collanti, inchiostri, adesivi e prodotti per la pulizia (Hoet *et al.*, 2009).

Il benzene presente in atmosfera deriva da processi evaporativi diretti come le emissioni industriali, o indiretti derivati dall'uso del petrolio e dei suoi sottoprodotti, da processi di combustione incompleta sia di natura antropica (veicoli a motore), che naturale (incendi boschivi, decomposizione di materia organica, emissioni vulcaniche) in conseguenza di questa ampia origine è raro trovare nel mondo habitat incontaminati (Galbraith *et al.*, 2010).

I gas di scarico dei veicoli a motore alimentati con benzina rappresentano la principale fonte di emissione di benzene, esso viene aggiunto, in concentrazioni prossime all'1%, insieme ad altri composti aromatici (toluene, etil-benzene, xileni), per conferire le volute proprietà antidetonanti (espresse in "numero di ottano") in sostituzione totale dei composti del piombo (piombo tetraetile) nel caso della benzina "verde". I principali costituenti delle benzine senza piombo includono idrocarburi aromatici quali benzene, toluene, etilbenzene e xilene (BTEX) dotati di proprietà antidetonanti (indicate dal numero di ottani). Tuttavia, data la loro tossicità, l'attuale direttiva dell'Unione Europea (2009/30/EC) ha abbassato il livello massimo di BTEX nelle benzine dal 42% al 35% in volume e il livello di benzene a valori non superiori all' 1% in volume. Il metil-terz-butil etere (MTBE) ed altri composti ossigenati vengono attualmente utilizzati per aumentare il numero di ottani.

3.1.1 Assorbimento e distribuzione

Generalmente in ambito industriale ed artigianale l'assorbimento dei tossici avviene principalmente attraverso le vie aeree. La dispersione di vapori di queste sostanze nell'ambiente lavorativo è il fattore principale che determina una possibile penetrazione nel tratto respiratorio dei lavoratori.

La via dermica rappresenta un'ulteriore via di penetrazione del tossico nell'organismo, trascurabile in alcuni casi, acquisisce notevole importanza per alcuni solventi, per determinate mansioni e situazioni lavorative d'impiego del solvente o della stessa miscela.

Le dimensioni delle molecole tossiche, sono tra le caratteristiche fisiche che maggiormente influenzano il raggiungimento delle parti più profonde del polmone (comprese le aree di scambio alveolo-capillare).

Nei primi minuti di esposizione l'assorbimento polmonare per il benzene è prossimo al 70-80% ovvero la sua concentrazione in aria (espressa come pressione parziale del solvente nell'aria) media un suo notevole trasferimento nel sangue. La saturazione completa del compartimento ematico richiederebbe dai 2 ai 3 giorni di esposizione continuativa. La quota assorbita dal sangue si distribuisce altrettanto rapidamente nell'organismo. Attraverso la via cutanea (contatto con la sostanza allo stato liquido) il benzene viene assorbito in una quantità oraria pari a $0.4\text{mg}/\text{cm}^2$. Questo aspetto è stato osservato da studi sull'esposizione occupazionale a benzene condotti da Laitinen et al. in cui si dimostrava un assorbimento dermico molto importante in relazione alle varie condizioni e mansioni di lavoro (Laitinen *et al.*, 1994).

Le caratteristiche lipofile del benzene determinano un preferenziale tropismo per i tessuti adiposi o ad elevato contenuto lipidico. Utilizzando i metaboliti del benzene (fenolo, catecolo e idrochinone) come traccianti dell'avvenuto assorbimento e distribuzione del tossico, questi sono stati rivelati nel sangue e midollo osseo in seguito ad esposizione a benzene (6 ore), mostrando

livelli nel midollo osseo che superano i corrispondenti livelli nel sangue chiarendo, da subito, la preferenziale tossicità nei confronti del tessuto ematopoietico.

3.1.2 Metabolismo ed eliminazione

Lo *step* iniziale del metabolismo del benzene, mediato dal complesso multienzimatico CYP450 (isoenzima 2E1), determina l'ossidazione del benzene a benzene ossido (eossido). Da questo intermedio prendono vita 3 differenti *pathway* metabolici. Il *pathway* predominante determina la formazione del fenolo. Questo prodotto metabolico, quantitativamente il più importante nell'uomo, si crede derivare per via non enzimatica direttamente dal benzene ossido o in seguito ad un suo riarrangiamento strutturale o mediante un meccanismo di catalisi acida con successiva aromatizzazione. Il fenolo può essere escreto in urina come solfo o glucuro coniugati (80-90% della dose assorbita) o può essere ossidato, sempre per intervento dell'isoenzima 2E1 del complesso multienzimatico CYP450, a idrochinone e catecolo, la cui ulteriore ossidazione determina la formazione dell'1,2,4-benzenetriolo. A partire dal catecolo ed idrochinone, sempre attraverso la via del CYP450, questi possono essere ulteriormente ossidati a para-benzochinone e orto-benzochinone. I metaboliti idrossilati del benzene (catecolo, idrochinone e 1,2,4 triidrossi benzene), come il fenolo, sono metabolizzati in glucuro-coniugati e solfo-coniugati ed escreti nelle urine.

Il secondo *pathway* determina la formazione dell'1,2-diidrodiole-benzene via eossido idrolasi, che può essere ulteriormente ossidato a trans-trans muconaldeide, una specie chimica reattiva ad anello aperto. Il metabolismo subito da quest'ultimo prodotto determina prima la formazione di una specie ibrida a parziale ossidazione (funzione carbossilica e aldeidica) poi la produzione della forma completamente ossidata, l'acido trans,trans-muconico escreto direttamente nelle urine (3-18% della dose assorbita).

Il benzene ossido, sotto l'influenza della glutazione-S-trasferasi, seguendo un *pathway* metabolico minore, può reagire con il glutazione formando l'acido pre-fenilmercapturico (6-N-

acetilcisteinil-S-2-4-cicloesadienolo). In condizioni acide, questo metabolita è aromatizzato attraverso disidratazione ad acido S-fenil-mercapturico e successivamente eliminato attraverso le urine (<1% della dose assorbita) assieme al suo diretto precursore. Una quota di benzene non metabolizzato può essere escreto direttamente nelle urine per diffusione passiva dal sangue durante il processo di filtrazione glomerulare renale (0.1% della dose assorbita) (Fustinoni *et al.*, 2005).

Una percentuale variabile della dose di benzene assorbito è eliminata anche attraverso la respirazione, l'entità della stessa è funzione dei livelli ventilatori e dei livelli individuali di metabolizzazione.

In ultimo ricordiamo l'esistenza di una l'interazione metabolica tra etanolo e benzene per soggetti contemporaneamente esposti ai due chimici: questa determina un potenziamento degli effetti ematotossici e di depressione del sistema nervoso centrale. Inoltre, differenze genetiche (polimorfismi genetici) o acquisite (consumo di alcol, diabete) nell'attività del CYP450 potrebbero essere in parte responsabili delle differenze inter-individuali di tossicità del benzene (Seaton *et al.*, 1994).

3.1.3 Effetti dell'esposizione benzene

In caso di esposizione acuta, il benzene è irritante per la pelle e le mucose e, al pari di altri solventi organici, ha un effetto sul sistema nervoso centrale. A seconda del livello di concentrazione o delle dosi, il benzene può causare vertigini, stordimento, mal di testa e stimoli di vomito. Concentrazioni elevate (700 ppm) provocano la perdita di conoscenza ed esposizioni a livelli molto alti possono condurre alla morte. Esposizioni prolungate e ripetute al benzolo evidenziano in primo luogo un effetto ematotossico, che coinvolge tutte le cellule dell'emocromo ed è suscettibile di provocare anemia, leucocitopenia, linfocitopenia, trombocitopenia, nonché pancitopenia e anemia aplastica.

Oggi è possibile partire dal presupposto che le esposizioni al benzene incrementano il rischio per tutte le malattie sistemiche emato-linfatiche maligne, le cui cellule derivano dalle cellule staminali.

Inoltre, sono stati evidenziati effetti ematotossici e cancerogeni a livelli di esposizione inferiori ad 1 ppm (Lan *et al.*, 2004) e non è nota una soglia di esposizione al di sotto della quale non esiste alcun rischio (Glass *et al.*, 2003), pertanto il problema attuale riguarda gli effetti dell'esposizione a basse dosi di benzene.

3.1.4 Possibili meccanismi di danno indotti dal benzene

3.1.4.1 Danno ossidativo al DNA

Il meccanismo responsabile della tossicità del benzene non è ancora del tutto chiaro, tuttavia è stato dimostrato come i prodotti del metabolismo del benzene siano responsabili della generazione di specie radicali dell'ossigeno (ROS) che inducono danno ossidativo a livello delle basi azotate del DNA e in particolare della guanina, portando alla generazione di 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-oxodGuo), 8-idrossi-7,8-diidroguanosina (8-oxoGuo) e 8-idrossi-7,8-diidroguanina (8-oxoGua). Tra queste, l'8-oxodGuo sembra essere altamente mutagena determinando la perdita del normale appaiamento tra le basi e sembra essere coinvolta nella carcinogenesi indotta dal benzene. Difatti l'8-oxodGuo si appaia con l'adenina invece che con la citosina determinando la trasversione G-T (Loft *et al.*, 2008).

Inoltre, per quanto riguarda la 8-oxoGua, essa riflette il danno alla guanina in posizione 8 ed origina in parte da specifiche attività glicosilasiche del sistema di riparazione per escissione di basi (BER) tra cui la 7,8-diidro-8-oxoguanina DNA glicosidasi umana (hOgg1) o ancora potenzialmente dal turnover o dalla riparazione dell'RNA (Lunec *et al.*, 2002) (Manini *et al.*, 2009).

Dal momento che tali indicatori di effetto possono essere dosati nel sangue periferico o nelle urine, per il monitoraggio biologico dei lavoratori o per studi sulla popolazione generale, si predilige l'utilizzo delle urine per la non invasività del campionamento. La determinazione non invasiva nello stesso campione urinario utilizzato per determinare indicatori di esposizione a benzene potrebbe essere utile per valutare lo stress ossidativo e l'efficacia dei sistemi di riparazione del danno ossidativo al DNA e all'RNA in soggetti professionalmente esposti al solvente organico. A causa delle proprietà antiossidanti dell'urina, questi indicatori sono stabili per anni, se i campioni sono adeguatamente conservati. Per il dosaggio vengono utilizzate tecniche cromatografiche accoppiate a spettrometria di massa.

3.1.4.2 Metilazione degli acidi nucleici

Le modificazioni epigenetiche sono coinvolte nella regolazione della struttura della cromatina e controllano l'espressione genica senza però alterare la sequenza nucleotidica e forniscono le basi per comprendere gli effetti biologici degli agenti tossici ambientali. I meccanismi epigenetici spiegano la capacità di alcuni xenobiotici (privi di attività mutagena o mutageni deboli) di avviare un processo che può portare alla comparsa di tumori maligni. Possono essere suddivisi in 3 gruppi: metilazione del DNA, modificazioni post-trasduzionali degli istoni e alterazioni di piccole molecole di RNA non codificanti, note come RNA interference (Stein, 2012).

La metilazione del DNA è di fondamentale importanza per una un'ampia gamma di funzioni cellulari quali: la stabilità del genoma, l'imprinting genomico, l'inattivazione del cromosoma X, la regolazione genica tessuto-specifica e l'invecchiamento. Avviene principalmente a livello della citosina e consiste nel legame covalente di un gruppo metilico dal donatore S-adenosilmetionina al carbonio in posizione 5' dell'anello pirimidinico di una citosina che precede una guanina con formazione di 5-Metilcitosina (5-MeCyto). Nel genoma umano le 5-MeCyto sono presenti soprattutto a livello delle sequenze ripetute CpG localizzate nella regione regolatoria di numerosi geni e a livello delle sequenze ripetitive del DNA. Per alcuni geni la

metilazione è sufficiente per la creazione delle fisiologiche configurazioni di metilazione, mentre per altri sono necessarie demetilazioni al fine di generare il profilo di metilazione desiderato. Basi metilate come l'O⁶-MetilGuanina (O⁶-MeGua), l'1-MetilGuanina (1-MeGua), la 7-MetilGuanina (7-MeGua) e la 5-Metilcitosina, (5-MeCyto) e le forme omologhe contenenti il deossiribosio, escrete in forma libera nelle urine, sono tra i prodotti generati da questi meccanismi di riparazione.

Alterazioni dei normali profili di metilazione, causate da esposizioni ad agenti alchilanti, determinano instabilità del genoma e sono coinvolte nel processo dei carcinogenesi (Foley *et al.*, 2009).

L'epigenoma è influenzato da molteplici fattori, tra questi: età, alcol, fumo di sigaretta, chemioterapici, interferenti endocrini (dietilstilbestrolo, bisfenolo A, genisteina), fungicidi (vinclozolina) e pesticidi (metossichlor), metalli pesanti (cromo, cadmio, arsenico), radiazioni ionizzanti ed ultraviolette (De Palma *et al.*, 2009).

La metilazione del RNA, ed in particolare dell'RNA messaggero (mRNA), è coinvolta nel controllo dell'espressione genica rappresentando un ulteriore meccanismo epigenetico. Il processo di *capping* è una delle tappe di maturazione del pre-RNA in mRNA e consiste nell'aggiunta di un cappuccio di guanosina al residuo 5' terminale dell'acido nucleico con un legame 5'-5' trifosfato (G5'ppp5'X). La reazione successiva catalizzata dall'enzima RNA-guanina 7-metiltransferasi (RNMT) consiste nell'aggiunta di un gruppo metilico in posizione N7 del capping di guanosina (cap 7-MeGuo). Il cap 7-MeGuo è essenziale per un'efficiente espressione genica e rende più stabile l'mRNA in quanto lo protegge dalla degradazione sia da parte di endonucleasi che di ribonucleasi. E' possibile determinare i livelli di concentrazione di alcune forme metilate dell'RNA come la sopracitata 7-MeGuo e la 5-Metilcitosina, (5-MeCyt), escreti in forma libera nelle urine, anche se non è ancora noto se queste derivino dal normale *turnover* dell'RNA e/o da specifici sistemi di riparazione dello stesso.

3.1.5 Tossicità da esposizione a basse dosi di benzene

Negli ultimi anni sono stati effettuati diversi studi per indagare il rischio ematotossico e cancerogeno derivante dall'esposizione a basse dosi di benzene.

Un studio caso-controllo effettuato in Taiwan, aveva valutata la relazione tra inquinamento atmosferico, legato alla presenza dello stabilimento petrolchimico, e leucemia infantile utilizzando come casi i bambini morti per leucemia e come controlli le morti infantili da altre cause nel periodo 1995-2005. I risultati mostravano che i bambini che vivevano nelle vicinanze dell'industria petrolchimica esposti a maggior inquinamento atmosferico presentavano un aumento statisticamente significativo del rischio di leucemia rispetto al gruppo di controllo che viveva nei comuni distanti dallo stabilimento (Weng *et al.*, 2008).

Per valutare una relazione tra neoplasie linfoematopoietiche ed esposizioni a basse dosi di benzene è stata effettuata un'analisi di 3 studi caso-controllo (370 casi e 1587 controlli) su lavoratori, reclutati in Canada, Inghilterra (addetti alla distribuzione del petrolio) e Australia (addetti alla distribuzione, raffinazione e fase *up-stream* del petrolio), esposti a concentrazioni relativamente basse di benzene con una media di esposizione cumulativa inferiore a 10 ppm/anni (0,2-0,3 ppm per circa 20 anni). Da questo studio è emersa una forte relazione dose-risposta tra esposizione cumulativa a basse dosi di benzene e la sindrome mielodisplastica (SMD) e suddividendo i lavoratori in base alla mansione specifica è stato osservato un aumento statisticamente significativo del rischio di sviluppare SMD soprattutto per gli autisti addetti al trasporto di cisterne. La relazione dose-risposta appariva invece di scarso significato per leucemia mieloide acuta (LMA), leucemia mieloide cronica (LMC), leucemia linfatica cronica (LLC) e sindrome mieloproliferativa (SMP). Da questi risultati emerge il concetto che bassi livelli di benzene rappresentino un rischio per SMD ma non per LMA, suggerendo che la SMD potrebbe essere il rischio più rilevante in caso di esposizioni a basse dosi (Schnatter *et al.*, 2012).

Alterazioni nella metilazione del DNA tra cui l'ipometilazione globale, l'ipermetilazione o l'ipometilazione gene specifica e la perdita di imprinting (LOI) si verificano in corso di LMA e altre neoplasie. Studi recenti hanno mostrato che vi sono delle alterazioni nei profili di metilazione del DNA a seguito dell'esposizione a benzene, ad idrocarburi policiclici aromatici ed ad inquinanti organici persistenti (POPs) (Stein *et al.*, 2012).

3.1.6 Gli indicatori di esposizione a basse dosi di benzene

Uno studio effettuato nella città di Parma, aveva valutato l'esposizione a benzene in una corte di 37 taxisti determinando come vi fosse un incremento statisticamente significativo del benzene urinario e del suo metabolita, l'acido S-fenil-mercapturico (S-PMA), alla fine del turno lavorativo. Inoltre, dallo studio effettuato per determinare i polimorfismi della glutatione S-transferasi, quali indicatori di suscettibilità, era stata evidenziata una maggiore produzione di S-PMA nei soggetti con polimorfismo GSTM1 positive rispetto ai soggetti GSTM1 negative (Manini *et al.*, 2006).

Successivamente, in uno studio in cui erano stata valutata l'esposizione a benzene in una corte di benzinai della città di Parma, si metteva in evidenza come i livelli di MTBE-U fossero influenzati dalla sola esposizione professionale a vapori di benzina, mentre quelli di B-U ed S-PMA dipendevano sia dall'abitudine tabagica che dall'esposizione professionale (De Palma *et al.*, 2012).

Inoltre, l'MTBE, utilizzato quale indicatore di esposizione all'inquinamento ambientale da traffico veicolare, è ritenuto un indicatore specifico e sensibile, in grado di discriminare le basse esposizioni non rilevabili con la sola determinazione del B-U (Apostoli *et al.*, 2004).

Uno studio condotto su un gruppo di vigili urbani della città di Parma, mostrava come le concentrazioni urinarie di S-PMA e U-B fossero abbastanza sensibili e specifiche da rilevare cambiamenti delle concentrazioni di benzene atmosferico nell'ordine di pochi $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Manini *et al.*, 2008). Lo stesso gruppo di lavoro, in uno studio successivo in cui valutava l'associazione tra

il danno ossidativo al DNA ed esposizioni a basse dosi di benzene in benzinai, taxisti e vigili urbani della città di Parma, mostrava come nell'intero gruppo di lavoratori vi fosse una correlazione statisticamente significativa tra i 3 biomarcatori di danno ossidativo (8-oxodGuo, 8-oxoGuo, 8-oxoGua) e tra questi ultimi e i biomarcatori di esposizione (S-PMA e t,t-MA) (Manini *et al.*, 2010).

Inoltre, svariati studi hanno reclutato bambini e adolescenti, in quanto particolarmente sensibili agli effetti dell'inquinamento atmosferico per diverse ragioni tra cui, sistemi metabolici incompleti, sistema immunitario immaturo, alti tassi di infezioni respiratorie, per valutare gli indicatori di esposizione a benzene. Per esempio, l'impatto sulla salute della popolazione è stato valutato in uno studio effettuato in Belgio in cui venivano reclutati adolescenti residenti in aree inquinate in prossimità di un inceneritore e due fonderiee adolescenti residenti in aree rurali. Tale studio dimostrava come i bambini residenti nelle aree inquinate rispetto ai bambini residenti in aree rurali andavano incontro a maturazione sessuale in un'età più avanzata e nei maschi il volume testicolare era più piccolo. Inoltre, gli indicatori di danno al DNA correlavano significativamente con i metaboliti urinari degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e con quelli dei composti organici volatili, in particolare evidenziando per il benzene una correlazione significativa tra 8-oxodGuo e t,t-MA nelle urine (Staessen *et al.*, 2001).

Studi recenti su bambini residenti in città a diverso livello di urbanizzazione hanno evidenziato una correlazione dose-effetto fra le concentrazioni di benzene e dei suoi metaboliti (S-PMA e t,t-MA) urinari e danno ossidativo agli acidi nucleici, quest'ultimo valutato mediante gli indicatori di effetto 8-oxodGuo e 8-oxoGuo (Buthbumrung *et al.*, 2008). Questo studio evidenziava come l'esposizione a maggiori concentrazioni di benzene nei bambini residenti in aree urbane partecipasse all'instaurarsi di un danno ossidativo con possibili ripercussioni sullo stato di salute, associando tale danno anche a una possibile interazione di diversi inquinanti ambientali, quali IPA, 1,3-butadiene e benzene (Buthbumrung *et al.*, 2008).

La correlazione dose-effetto è stata riscontrata anche in un precedente studio, condotto dal nostro gruppo di ricerca, che coinvolgeva 396 bambini reclutati in tre diverse aree della regione Lazio, Leonessa (area rurale), Cassino (area urbana con 32,886 di abitanti) e Roma (area urbana con 2,743,796 di abitanti). Le postazioni fisse di rilevamento dell'ARPA avevano misurato dei valori di benzene ambientale di 0,83 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ a Leonessa, 2,1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ a Cassino e 3,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ a Roma. A livello dei campioni di urine erano stati dosati gli indicatori di esposizione a benzene (benzene immutato, S-PMA, t,t-MA), gli indicatori di effetto, ovvero di danno ossidativo agli acidi nucleici (8-oxodGuo, 8-oxoGuo, 8-oxoGua). I risultati mostravano una correlazione significativa tra indicatori di esposizione a benzene e il danno ossidativo agli acidi nucleici, in particolare tra 8-oxodGuo e 8-oxoGuo e i due indicatori di esposizione, ovvero S-PMA e t,t-MA. Inoltre, si osservava come le concentrazioni di tutti i biomarcatori del benzene aumentassero in funzione del livello di urbanizzazione (Leonessa<Cassino<Roma) (Andreoli *et al.*, 2012).

Inoltre, è stato visto come la concentrazione di cotinina urinaria (indicatore di esposizione a fumo di tabacco), dipendente dal numero di conviventi fumatori, correla positivamente con le concentrazioni di benzene urinario, il quale viene influenzato sia dall'esposizione a fumo passivo che dal livello di urbanizzazione, diversamente dalle concentrazioni urinarie dei metaboliti del benzene che vengono influenzate solo da quest'ultimo parametro (Protano *et al.*, 2012).

Nello specifico, l'acido trans,trans-muconico (t,t-MA) rappresenta un indicatore sensibile per esposizioni a basse dosi di benzene fino a 0,1 ppm con un'emivita di circa 5 ore. Inoltre, questo indicatore è circa due volte più elevato nei fumatori (130 $\mu\text{g}/\text{g}$ di creatinina) rispetto ai non fumatori (60 $\mu\text{g}/\text{g}$ di creatinina). Tuttavia una quota non trascurabile di t,t-MA urinario deriva anche dalla biotrasformazione dell'acido sorbico, il quale è presente in alcuni alimenti come conservante. Nei soggetti non professionalmente esposti, si è osservato un apporto con la dieta pari a 5-30 mg di acido sorbico al giorno, il quale è responsabile dell'escrezione urinaria di t,t-MA. Nei soggetti professionalmente esposti sono stati riscontrati invece dei valori urinari di

circa 500 e 1000 $\mu\text{g/g}$ di creatinina per esposizioni rispettivamente di 0,5 ppm e 1 ppm di benzene (Lauwerys *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda l'acido S-fenilmercapturico (S-PMA) diversi studi hanno evidenziato come le concentrazioni urinarie di S-PMA permettono di determinare esposizioni a basse dosi di benzene (<1ppm), inoltre, l'escrezione urinaria non è influenzata dall'apporto con la dieta di acido sorbico, come nel caso del t,t-MA. Per un corretto monitoraggio biologico bisognerebbe determinare i polimorfismi genetici dell'enzima glutatione S-transferasi (GSTM1, GSTT1, GSTA1, GSTA2 e GSTP1) che influenzano la formazione di S-PMA. Nei soggetti fumatori le concentrazioni urinarie di S-PMA sono da 5 a 8 volte più elevate rispetto ai soggetti non fumatori, con concentrazioni in soggetti non fumatori e non professionalmente esposti di circa 0,7 $\mu\text{g/g}$ di creatinina. Nei soggetti professionalmente esposti sono state riscontrate concentrazioni urinarie medie di S-PMA di circa 46 $\mu\text{g/g}$ di creatinina per esposizioni a 1 ppm di benzene (Lauwerys *et al.*, 2007). Per esposizioni a basse dosi di benzene (<10 ppm) esiste una buona correlazione tra livelli di S-PMA ($\mu\text{g/g}$ creatinina) nelle urine e le concentrazioni ambientali di benzene (mg/m^3). Pertanto l'S-PMA può essere considerato come un ottimo indicatore per il monitoraggio biologico nei lavoratori esposti (Lv *et al.*, 2014). Il valore limite biologico (BEI) proposto dall'ACGIH (2008) è di 500 $\mu\text{g/g}$ di creatinina per il t,t-MA e di 25 $\mu\text{g/g}$ di creatinina per l'S-PMA su campioni di urina raccolti a fine turno lavorativo (ACGIH).

Il benzene urinario (B-U) è stato dimostrato, da diversi studi, come possa essere utilizzato per identificare lavoratori esposti a basse concentrazioni ambientali quali i vigili urbani, i benzinai e gli operai petrolchimici (Bergamaschi *et al.*, 1999; De Palma *et al.*, 2012). Tuttavia, le difficoltà analitiche, oltre che la mancanza di valori di riferimento nella popolazione generale e di un valore limite biologico e la sua breve emivita (circa 2 ore) hanno limitato l'utilizzo del B-U da utilizzare come marcatore dell'esposizione a basse dosi di benzene.

Inoltre, va considerato che il fattore fumo contribuisce in misura non marginale all'esposizione a benzene, di conseguenza deve essere considerato come fattore interferente in qualunque indicatore utilizzato per la valutazione dell'esposizione. A tal proposito risulta rilevante il dosaggio della cotinina, un metabolita della nicotina, come indice di esposizione a fumo di sigaretta sia attivo che passivo. Recenti studi hanno evidenziato una correlazione significativa tra le concentrazioni di B-U e cotinina sia in benzinai esposti a basse concentrazioni ambientali di benzene che in bambini esposti a fumo passivo (De Palma *et al.*, 2012, Protano *et al.*, 2012).

3.2 OBIETTIVO DELLO STUDIO

Come discusso in precedenza, numerosi studi hanno evidenziato come i lavoratori esposti a benzene presentano un profilo di rischio anche per le esposizioni a basse dosi. Inoltre, svariate attività industriali, responsabili del rilascio in atmosfera del benzene, sono spesso situate non lontano da centri abitati. Di conseguenza dal punto di vista della sanità pubblica vi è l'interesse nell'effettuare il monitoraggio ambientale e biologico anche per soggetti che non sono professionalmente esposti. In questo studio abbiamo reclutato una coorte di bambini nel contesto industriale di Milazzo, dove è presente uno stabilimento petrolchimico, e dove i livelli medi di benzene ambientale sono di circa $0,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (dati ARPA). La popolazione in studio è rappresentata dai bambini, in quanto essi sono più suscettibili agli effetti dell'inquinamento atmosferico per diverse ragioni tra cui i sistemi metabolici incompleti, il sistema immunitario immaturo e alti tassi di infezioni respiratorie.

Gli obiettivi in questo studio erano di caratterizzare una eventuale relazione dose-effetto per livelli bassi di benzene ambientale, oltre che quantificare il danno ossidativo al DNA, mediante la determinazione delle concentrazioni urinarie di indicatori di effetto, quali l'8-oxodGuo, l'8-oxoGuo e 8oxoGua. Inoltre, abbiamo valutato se le concentrazioni degli indicatori di esposizione (B-U, S-PMA, MTBE e *t,t*-MA) e di effetto (8-oxodGuo, 8-oxoGuo e 8oxoGua) potessero essere influenzate dal grado di industrializzazione e dal momento del prelievo. Infine abbiamo confrontato le concentrazioni urinarie di basi metilate del DNA e dell'RNA nei bambini frequentanti le scuole elementari situate a differente distanza dalla raffineria petrolchimica di Milazzo al fine di valutare il possibile utilizzo delle basi metilate urinarie come indicatori di effetto per esposizioni a basse dosi di agenti inquinanti.

3.3 MATERIALI E METODI

3.3.1 Disegno dello studio e popolazione esposta

Sono stati reclutati 203 bambini di diversi distretti scolastici di cui 149 frequentanti le scuole elementari situate in prossimità della raffineria di Milazzo e 54 frequentanti la scuola di Nizza, città a basso grado di urbanizzazione e industrializzazione a 72 Km da Milazzo. In particolare i 149 bambini frequentanti le scuole di Milazzo sono stati suddivisi in due gruppi in base alla distanza della scuola frequentata dalla raffineria petrolchimica. Il gruppo dei “vicino”, costituito da 127 bambini frequentanti le scuole distanti meno di 5 Km dalla raffineria, e il gruppo “lontano”, costituito da 22 bambini frequentanti le scuole distanti più di 5 Km dalla raffineria. Ad ciascun bambino sono stati raccolti due campioni di urina, uno della sera e uno della mattina successiva, nei mesi di Aprile, Maggio e Giugno 2013. Inoltre, è stato somministrato a ciascun bambino un questionario, compilato dai genitori, per ottenere svariate informazioni concernenti particolarità di tipo socio-demografiche dell’area di residenza, delle attività giornaliere e l’esposizione a fumo passivo dei bambini.

3.3.2 Monitoraggio ambientale

Per la valutazione delle concentrazioni medie ponderate nel tempo (TWA) degli inquinanti ambientali sono stati utilizzati i dati registrati dalla postazione fissa di rilevamento dell’ARPA di Milazzo nei giorni in cui sono stati effettuati i campionamenti biologici.

3.3.3 Monitoraggio biologico

Per il monitoraggio biologico dell’esposizione a benzene ed altri idrocarburi aromatici, a ciascun bambino è stato chiesto di raccogliere due campioni di urine, con un volume di circa 50 ml, uno alla sera prima di andare a dormire e l’altro alla mattina del giorno successivo prima di andare a scuola. I campioni sono stati suddivisi in diverse aliquote e subito congelati.

Inoltre, per la determinazione delle concentrazioni di BTEX e di MTBE, è stata preparata un'aliquota di 2 ml di campione immessa in *vials* di vetro, a tenuta, contenenti 0.5 g di NaCl, cloruro di sodio, ed una miscela di standard interni, e conservati a -20°C fino all'analisi.

3.3.4 Determinazione del MTBE

Per la determinazione delle concentrazioni urinarie di MTBE, abbiamo utilizzato la microestrazione in fase solida (SPME, *solid-phase microextraction*) dello spazio di testa con successiva analisi in gascromatografia accoppiato alla spettrometria di massa (GC-MS). Il campionamento è stato effettuato utilizzando una fibra Carboxen/PDMS (75 µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA), che è stata esposta nello spazio di testa dei campioni per 35 minuti. Per favorire il passaggio degli analiti dalla fase liquida a quella gassosa ed aumentare l'efficienza dell'estrazione, i campioni sono stati riscaldati alla temperatura di 45°C e mantenuti sotto agitazione per tutta la durata del campionamento. Gli analiti sono stati desorbiti termicamente dalla fibra, che è stata posta nell'iniettore del gascromatografo, ad una temperatura di 280°C per 10 minuti.

L'analisi GC-MS è stata effettuata utilizzando un gascromatografo HP 5890 (Hewlett Packard) accoppiato ad uno spettrometro di massa modello HP 5973, con sorgente a impatto elettronico. La separazione degli analiti è stata ottenuta con una colonna capillare siliconica universale (CP-SIL 5CB-MS, 30 m x 0.25 mm d.i., film 0.25 µm) ed utilizzando idrogeno (H₂) come gas di trasporto, ad un flusso pari a 1 ml al minuto. L'acquisizione è stata realizzata in modalità SIM (*Selected Ion Monitoring*), per ottenere la massima sensibilità del sistema di rivelazione. Le concentrazioni dell'MTBE sono state espresse in µg/L.

3.3.5 Determinazione dei metaboliti urinari del benzene

La determinazione dei metaboliti urinari del benzene, quali l'acido *t,t*-muconico (*t,t*-MA) e l'acido *S*-fenilmercapturico (*S*-PMA), è stata eseguita mediante cromatografia liquida accoppiata

alla spettrometria di massa *tandem* (LC-MS/MS) e diluizione isotopica. Le analisi sono state effettuate utilizzando uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo modello API 4000 (AB-Sciex, Framingham, MA, USA), dotato di una interfaccia *Turboionspray* per la ionizzazione *electrospray* (ESI) assistita pneumaticamente. I metaboliti del benzene sono stati separati utilizzando una colonna Atlantis®dC18 (100 x 3.0 mm i.d., 3 µm, Waters) ed una fase mobile composta da acido formico acquoso (10 mM, pH=3,75 per aggiunta di idrossido d'ammonio) e metanolo in proporzioni variabili (gradiente di eluizione). Prima dell'iniezione in colonna di un volume di 10 µl, i campioni di urina sono stati centrifugati a 10.000 rpm per 5 minuti, acidificati con acido formico (0.1 M), ed addizionati di una miscela di standard interni marcati con deuterio.

L'acquisizione in MS/MS è stata ottenuta in modalità SRM (*Selected Reaction Monitoring*), una modalità che consente di ottenere la massima sensibilità e selettività della spettrometria di massa *tandem*. Per i metaboliti del benzene e per gli omologhi marcati isotopicamente (utilizzati come SI) sono state monitorate le transizioni caratteristiche di ciascun composto, ovvero m/z 141→97 per *t,t*-MA; m/z 238→109 per *S*-PMA; m/z 145→101 per *t,t*-MA-*d*4; ed m/z 243→114 *S*-PMA-*d*5.

Le concentrazioni dei metaboliti urinari sono state espresse in funzione della concentrazione della creatinina urinaria (µg/g creatinina), determinate con il metodo di Jaffè.

3.3.6 Determinazione della cotinina urinaria

Per caratterizzare l'esposizione passiva a fumo di tabacco, il principale interferente nel monitoraggio biologico dell'esposizione a benzene, è stata determinata la concentrazione della cotinina urinaria, metabolita della nicotina. La determinazione della cotinina in campioni di urina è stata effettuata mediante LC-MS/MS utilizzando uno spettrometro di massa ABSciex a triplo quadrupolo modello API 4000 dotato di sorgente *TurboIonspray*. La separazione della cotinina è stata ottenuta utilizzando una colonna Atlantis®dC18 (100 x 3.0 mm i.d., 3 µm, Waters) ed una

fase mobile costituita da acido formico 10 mM (pH 3.75) e metanolo in gradiente di eluizione. Prima dell'analisi i campioni di urina sono stati centrifugati a 10.000 rpm per 5 minuti e addizionati con una soluzione di acido formico acquoso contenente lo standard interno. La ionizzazione degli analiti è stata ottenuta in ioni positivi e la rivelazione in MS/MS, in modalità SRM, monitorando le transizioni caratteristiche: m/z 177→80 per cotinina e m/z 180→101 per d3- cotinina. Il metodo sviluppato è stato validato mediante lo studio dell'intervallo di linearità, la determinazione dei limiti di rivelazione e della precisione (*intra-day* e *inter-day*). Le concentrazioni della cotinina determinata nelle urine sono state espresse in funzione della creatinina, misurata secondo il metodo di Jaffe.

3.3.7 Determinazione degli indicatori di stress ossidativo

Le concentrazioni di Guanina (Gua), 8-idrossi-7,8-diidroguanina (8-oxoGua), Guanosina (Guo), 8-idrossi-7,8-diidroguanosina (8-oxoGuo), 2'deossiguanosina (dGuo) e 8-idrossi-2'deossiguanosina (8-oxodGuo), escrete nelle urine in forma libera, sono state determinate mediante LC-MS/MS utilizzando uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo dotato di interfaccia *TurboIonSpray*. La separazione degli analiti è stata ottenuta utilizzando una colonna Atlantis®dC₁₈ (100 x 3,0 mm i.d., 3 µm, Waters) ed una fase mobile costituita da acido formico 10 mM (pH 3,75) e metanolo in gradiente di eluizione.

I campioni di urina sono stati centrifugati a 10.000 rpm per 5 minuti e addizionati con una soluzione di acido formico acquoso contenente la miscela degli SI. La ionizzazione degli analiti è stata ottenuta in ioni positivi e la rivelazione in MS/MS, in modalità denominata SRM, monitorando le transizioni caratteristiche di ciascun analita: m/z per Gua 152→135, per 8-oxoGua 168→140, per Guo 284→152, per 8-oxoGuo 300→168, per dGuo 268→152, per 8-oxodGuo 284→168

Il metodo sviluppato è stato validato mediante lo studio dell'intervallo di linearità, la determinazione dei limiti di rivelazione e della precisione (*intra-day* e *inter-day*). Le

concentrazioni di tutti gli analiti determinati sono state espresse in funzione della creatinina urinaria, determinata secondo il metodo di Jaffè.

3.3.8 Determinazione degli indicatori di metilazione degli acidi nucleici

Le concentrazioni di 1-MetilGuanina (1-MeGua), 7-MetilGuanina (7MeGua), O6-MetilGuanina (O6-MeGua), 7-metilGuanosina (7MeGuo), Citosina (Cyt), 5-MetilCitosina (5MeCyt), Citidina (Cyt), 5-MetilCitidina (5MeCyt), 2'deossiCitidina (dCyt), 5-Metil-2'deossiCitidina (5MedCyt), emesse nelle urine in forma libera, sono state determinate mediante LC-MS/MS utilizzando uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo dotato di interfaccia *TurboIonspray*. La separazione degli analiti è stata ottenuta utilizzando una colonna Atlantis®dC18 (100 x 3,0 mm i.d., 3µm, Waters) ed una fase mobile costituita da acido formico 10 mM (pH 3,75) e metanolo in gradiente di eluizione. Prima dell'analisi i campioni di urina sono stati centrifugati a 10.000 rpm per 5 minuti e addizionati con una soluzione di acido formico acquoso contenente la miscela degli SI. La ionizzazione degli analiti è stata ottenuta in ioni positivi e la rivelazione in MS/MS, in modalità denominata SRM, monitorando le transizioni caratteristiche di ciascun analita: m/z per 1-MeGua 166→135, per 7-MeGua 166→149, per O⁶-MeGua 166→134, per 7-MeGuo 166→134, per Cyt 112→69, per 5-MeCyt 126→83, per Cyt 244→112, per 5-MeCyt 258→126, per dCyt 228→112 e per 5-MedCyt 242→126.

Il metodo sviluppato è stato validato mediante lo studio dell'intervallo di linearità, la determinazione dei limiti di rivelazione e della precisione (*intra-day* e *inter-day*). Le concentrazioni di tutti gli analiti determinati sono state espresse in funzione della creatinina urinaria, determinata secondo il metodo di Jaffè.

3.3.9 Analisi statistiche

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando SPSS per Windows ®, Versione 21.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA). La normalità o log-normalità della distribuzione è stata valutata mediante il test di Kolmogorov-Smirnov; tutte le variabili presentavano una distribuzione log-normale per cui è stata applicata una statistica parametrica dopo la trasformazione logaritmica delle stesse.

Le differenze tra i gruppi sono state valutate utilizzando il test *t* di Student per campioni indipendenti, mentre l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test *post-hoc* di Bonferroni per confronti multipli è stata utilizzata nel caso di confronti tra più gruppi. Per il confronto dello stesso indicatore in campioni diversi dello stesso soggetto (mattina e sera) è stato utilizzato il test *t* di Student per dati appaiati.

Le correlazioni tra variabili sono state valutate tramite il coefficiente di correlazione *r* di Pearson.

Valori di $p < 0,05$ sono stati considerati significativi. Modelli di regressione lineare multipla sono stati applicati per studiare l'influenza di sesso, di esposizione a fumo passivo, di esposizione a benzene e della distanza dalla raffineria sull'escrezione urinaria degli indicatori di danno da ossidazione e da metilazione agli acidi nucleici.

3.4 RISULTATI

3.4.1 Monitoraggio ambientale

I dati del monitoraggio ambientali relativi ai mesi di aprile, maggio, giugno sono stati ricavati dalle postazioni fisse dell'ARPA posizionate in prossimità della Raffineria di Milazzo e sono state rilevate concentrazioni di benzene aerodisperso variabili nell'intervallo 0,02-1,09 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, con una media di 0,45 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

3.4.2 Monitoraggio biologico

I dati relativi al monitoraggio biologico del gruppo di bambini frequentanti scuole a diversa distanza dalla raffineria petrolchimica di Milazzo e del gruppo di controllo formato dai bambini frequentanti la scuola di Nizza sono stati espressi come media geometrica e deviazione standard geometrica dal momento che gli indicatori hanno mostrato una distribuzione logaritmica normale. Le concentrazioni urinarie dei metaboliti del benzene e della cotinina sono state espresse in $\mu\text{g}/\text{g}$ cr, mentre quelle del benzene tal quale (B-U) e del MTBE in $\mu\text{g}/\text{L}$.

3.4.3 Indicatori di esposizione

I risultati del monitoraggio biologico relativo agli indicatori di esposizione sono riportati in Tabella 1, in cui abbiamo stratificato i dati sulla base del diverso luogo di residenza dei bambini (Milazzo e Nizza) e in funzione del tempo di campionamento (Sera e Mattina successiva). I risultati mostravano che nel gruppo dei bambini residenti nella città a più alto grado di urbanizzazione (Milazzo, N=149) vi erano concentrazioni significativamente maggiori dei metaboliti del benzene, *S*-PMA e *t,t*-MA nei campioni urinari della sera rispetto a alla mattina successiva ($p < 0,0001$). Stesso andamento si osservava anche per i bambini residenti a Nizza, N=54, con differenze statisticamente significative solo per il *S*-PMA ($p < 0,0001$). I risultati della cotinina, mostravano concentrazioni significativamente maggiori nei campioni della sera solo nel

gruppo dei bambini di Milazzo ($p=0,003$) (**Tabella 3**). Successivamente abbiamo valutato anche l'effetto del grado di urbanizzazione del luogo di residenza sugli indicatori di esposizione. I risultati mostravano che le concentrazioni di MTBE erano statisticamente maggiori nelle urine dei bambini residenti a Milazzo rispetto a quelli residenti a Nizza sia alla sera ($p=0,031$) che al mattino seguente ($p=0,041$), mentre le concentrazioni di S-PMA erano maggiori solo nei campioni della sera ($p=0,011$). Il B-U, il *t,t*-MA, e la cotinina non hanno mostrato differenze significative (**Tabella 3**).

Indicatore	Milazzo		p	Nizza		p	Milazzo vs Nizza	
	Sera	Mattina		Sera	Mattina		Sera p	Mattina p
MTBE ($\mu\text{g/L}$)	0,79 [2,73]	0,82 [2,89]	n.s.	0,56 [2,27]	0,59 [2,56]	n.s.	0,031	0,041
B-U ($\mu\text{g/L}$)	0,20 [1,41]	0,21 [1,50]	n.s.	0,22 [1,30]	0,23 [1,35]	n.s.	n.s.	n.s.
S-PMA ($\mu\text{g/g cr}$)	0,20 [1,63]	0,15 [1,69]	<0,0001	0,17 [1,50]	0,14 [1,60]	<0,0001	0,011	n.s.
t,t-MA ($\mu\text{g/g cr}$)	48,1 [2,47]	38,9 [2,26]	<0,0001	53,9 [2,85]	40,4 [3,87]	n.s.	n.s.	n.s.
Cotinina ($\mu\text{g/g cr}$)	1,78 [2,02]	1,58 [1,93]	0,003	1,28 [3,04]	1,31 [2,66]	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 3. Concentrazioni dell'MTBE (indicatore di traffico veicolare) degli indicatori di esposizione a benzene (il B-U, l'S-PMA, l'*t,t*-MA) e della cotinina (indicatore di fumo passivo) in base al momento del campionamento (sera e mattina) e al livello di urbanizzazione (Milazzo e Nizza); i dati sono espressi come media geometrica e deviazione standard geometrica.

Legenda n.s.: non significativo; MTBE: metil-terz-butil etere; B-U: benzene urinario; S-PMA: acido S-fenilmercapturico; *t,t*-MA: acido *trans,trans* muconico. *t* di Student per dati appaiati per il confronto sera vs mattina, *t* di Student per dati indipendenti per il confronto Milazzo vs Nizza.

Inoltre, abbiamo diviso i bambini residenti a Milazzo in base alla distanza della scuola dalla raffineria in gruppo "Vicino", scuola a distanza di 5 Km dalla raffineria, e gruppo "Lontano", distanza maggiore di 5 Km dalla raffineria. I risultati ottenuti evidenziavano che nei campioni della sera le concentrazioni erano significativamente maggiori per l'S-PMA nel gruppo "Vicino" rispetto al gruppo "Lontano" ($p=0,045$), mentre per il *t,t*-MA non si osservavano differenze nei due gruppi (**Tabella 4**). L'MTBE risultava significativamente più alto nel gruppo "Vicino" rispetto ai bambini di Nizza ($p=0,049$) mentre le concentrazioni di B-U erano significativamente

maggiori nel gruppo “Lontano” rispetto al gruppo “Vicino” ($p=0,003$), e non si osservavano differenze significative rispetto ai bambini della scuola di Nizza. La cotinina rivelava concentrazioni significativamente maggiori nel gruppo “Vicino” rispetto al gruppo di Nizza ($p=0,045$).

Sera	Vicino alla raffineria	Lontano dalla raffineria	Nizza	Vicino vs Lontano	Vicino vs Nizza	Lontano vs Nizza
N	127	22	54	p	p	p
MTBE ($\mu\text{g/L}$)	0,83 [2,68]	0,62 [2,96]	0,57 [2,27]	n.s.	0,049	n.s.
B-U ($\mu\text{g/L}$)	0,20 [1,38]	0,25 [1,54]	0,22 [1,30]	0,003	n.s.	n.s.
S-PMA ($\mu\text{g/g cr}$)	0,21 [1,65]	0,16 [1,51]	0,17 [3,03]	0,045	0,007	n.s.
t,t-MA ($\mu\text{g/g cr}$)	47,3 [2,50]	52,93 2,33]	53,27 2,83]	n.s.	n.s.	n.s.
Cotinina ($\mu\text{g/g cr}$)	1,75 [2,06]	1,97 [1,82]	1,25 [3,03]	n.s.	0,045	n.s.

Tabella 4. Concentrazioni dell’MTBE (indicatore di traffico veicolare), degli indicatori di esposizione a benzene (il B-U, l’S-PMA, l’t,t-MA) e della cotinina (indicatore di fumo passivo) in base alla stratificazione vicino/lontano la raffineria e Nizza nei campioni della sera; i dati sono espressi come media geometrica e deviazione standard geometrica.

Legenda: n.s.: non significativo; MTBE: metil-terz-butil etere; B-U: benzene urinario; SPMA: acido S fenilmercapturico; t,t-MA: acido *trans, trans* muconico. ANOVA seguita dal test *post hoc* di Bonferroni.

Per quanto riguarda i campioni della mattina successiva, risultati riportati in Tabella 5, le concentrazioni urinarie di MTBE nel gruppo “Vicino” erano statisticamente più alte di quelle dei bambini di Nizza ($p=0,041$), mentre per quanto riguarda l’S-PMA la differenza significativa si osservava nel gruppo “Vicino” rispetto al gruppo “lontani” ($p=0,046$). Per il B-U e la cotinina non si osservava nessuna differenza significativa tra i diversi gruppi. Le differenze osservate tra i campioni della sera e i campioni del mattino nel gruppo di Milazzo si mantenevano significative anche stratificando i gruppi vicino/lontano la raffineria.

Mattina	Vicino alla raffineria	Lontano dalla raffineria	Nizza	Vicino vs Lontano	Vicino vs Nizza	Lontano vs Nizza
N	127	22	54	p	p	p
MTBE-U ($\mu\text{g/L}$)	0,89 [2,86]	0,54 [2,85]	0,59 [2,56]	n.s.	0,041	n.s.
B-U ($\mu\text{g/L}$)	0,21 [1,52]	0,23 [1,40]	0,23 [1,35]	n.s.	n.s.	n.s.
S-PMA ($\mu\text{g/g cr}$)	0,16 [1,70]	0,12 [1,52]	0,14 [1,60]	0,046	n.s.	n.s.
t,t-MA ($\mu\text{g/g cr}$)	38,85 [2,33]	37,3 [1,83]	40,16 [3,82]	n.s.	n.s.	n.s.
Cotina ($\mu\text{g/g cr}$)	1,59 [1,95]	1,55 [1,75]	1,30 [2,63]	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 5. Concentrazioni dell' MTBE (indicatore di traffico veicolare), degli indicatori di esposizione a benzene (il B-U, l' S-PMA, l' t,t-MA) e della cotinina (indicatore di fumo passivo) in base alla stratificazione vicino/lontano la raffineria e Nizza nei campioni della mattina; i dati sono espressi come media geometrica e deviazione standard geometrica.

Legenda: n.s.: non significativo; MTBE: metil-terz-butil etere; B-U: benzene urinario; SPMA: acido S fenilmercapturico; t,t-MA: acido *trans, trans* muconico. ANOVA seguita dal test *post hoc* di Bonferroni.

3.4.4 Indicatori urinari di danno ossidativo agli acidi nucleici

Anche per gli indicatori di danno ossidativo abbiamo confrontato le concentrazioni urinarie sulla base dei campionamenti effettuati la sera e la mattina successiva e della distanza della scuola dalla raffineria. I nostri risultati evidenziavano delle differenze statisticamente significative solo per le concentrazioni urinarie di 8-oxodGuo tra i campioni della sera e della mattina successiva sia nel gruppo di Milazzo ($p=0,006$) che nel gruppo di Nizza ($p<0,0001$). Inoltre, le concentrazioni di 8-oxodGuo erano significativamente maggiori nei bambini del gruppo di Milazzo rispetto a quelli del gruppo di Nizza, sia nei campioni della sera ($p<0,0001$) che in quelli della mattina successiva ($p<0,0001$) (**Tabella 6**), mentre la 8oxoGuo mostrava un andamento opposto con delle concentrazioni significativamente maggiori nel gruppo di Nizza rispetto al gruppo di Milazzo sia nei campioni della sera ($p=0,001$) che in quelli della mattina successiva ($p<0,0001$).

Indicatori	Milazzo		p	Nizza		p	Milazzo vs Nizza	
	Sera	Mattina		Sera	Mattina		Sera p	Mattina p
8oxodGuo µg/g cr	3,95 [1,47]	3,65 [1,42]	0,006	3,05 [1,50]	2,63 [1,53]	<0,0001	<0,0001	<0,0001
8oxoGuo µg/g cr	9,43 [1,83]	9,09 [1,68]	n.s.	12,5 [1,50]	12,08 [1,56]	n.s.	0,001	<0,0001
8oxoGua µg/g cr	17,8 [2,66]	15,74 [2,4]	n.s.	15,9 [2,94]	16,4 [2,86]	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 6. Concentrazioni degli indicatori urinari di ossidazione degli acidi nucleici in base al momento del campionamento e al livello di urbanizzazione (Milazzo/Nizza); i dati sono espressi come media geometrica e deviazione standard geometrica.

Legenda: n.s.: non significativo; 8-oxodGuo: 8-idrossi-2-deossiguanosina; 8-oxoGuo: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina; 8-oxoGua: 8-idrossi-7,8-diidroguanina. *t* di Student per dati appaiati per il confronto sera vs mattina, *t* di Student per dati indipendenti per il confronto Milazzo vs Nizza.

Inoltre, sono state riscontrate differenze statisticamente significative nelle concentrazioni di 8-oxodGuo ($p < 0,0001$) e di 8-oxoGuo ($p = 0,004$) con valori rispettivamente maggiori e minori nel gruppo dei bambini frequentanti le scuole vicino al petrolchimico rispetto al gruppo dei bambini frequentanti la scuola di Nizza. Non si osservavano delle differenze significative tra i diversi gruppi per le concentrazioni di 8-oxoGua (**Tabella 7**).

Sera	Vicino alla raffineria	Lontano dalla raffineria	Nizza	Vicino vs Lontano	Vicino vs Nizza	Lontano vs Nizza
N	127	22	54	p	p	p
8-oxodGuo (µg/g cr)	3,99 [1,50]	3,75 [1,31]	3,06 [1,50]	n.s.	<0,0001	n.s.
8-oxoGuo (µg/g cr)	9,40 [1,85]	9,54 [1,71]	12,62 [1,50]	n.s.	0,004	n.s.
8-oxoGua (µg/g cr)	16,66 [2,70]	26,15 [2,19]	15,93 [2,90]	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 7. Concentrazioni degli indicatori urinari di ossidazione degli acidi nucleici in base alla stratificazione vicino/lontano la raffineria e Nizza nei campioni della sera; i dati sono espressi come media geometrica e deviazione standard geometrica.

Legenda: n.s.: non significativo; 8-oxodGuo: 8-idrossi-2-deossiguanosina; 8-oxoGuo: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina; 8-oxoGua: 8-idrossi-7,8-diidroguanina. ANOVA seguita dal test *post hoc* di Bonferroni.

Per quanto riguarda i campioni del mattino si osservavano delle concentrazioni significativamente maggiori di 8-oxodGuo nei gruppi vicino e lontano rispetto al gruppo di Nizza (rispettivamente $p < 0,0001$ e $p = 0,018$), mentre le concentrazioni di 8oxoGuo risultavano maggiori nel gruppo dei bambini di Nizza rispetto sia al gruppo vicino ($p = 0,003$) sia a quello

lontano ($p=0,013$). Le concentrazioni di 8oxoGua mostravano valori più alti nel gruppo lontano rispetto a quello vicino ($p=0,037$) (**Tabella 8**).

Le differenze osservate tra sera e mattina nel solo gruppo di Milazzo si mantenevano significative anche con la stratificazione vicino/lontano la raffineria nel gruppo dei bambini vicino alla raffineria.

Mattina	Vicino alla raffineria	Lontano dalla raffineria	Nizza	Vicino vs Lontano	Vicino vs Nizza	Lontano vs Nizza
N	127	22	54	p	p	p
8-oxodGuo ($\mu\text{g/g cr}$)	3,67 [1,43]	3,44 [1,40]	2,66 [1,53]	n.s.	<0,0001	0,018
8-oxoGuo ($\mu\text{g/g cr}$)	9,16 [1,68]	8,36 [1,73]	12,02 [1,55]	n.s.	0,003	0,013
8-oxoGua ($\mu\text{g/g cr}$)	14,63 2,38	24,52 2,08	16,55 2,83	0,037	n.s.	n.s.

Tabella 8. Concentrazioni degli indicatori urinari di ossidazione degli acidi nucleici in base alla stratificazione vicino/lontano la raffineria e Nizza nei campioni della mattina; i dati sono espressi come media geometrica e deviazione standard geometrica.

Legenda: n.s.: non significativo; 8-oxodGuo: 8-idrossi-2'-deossiguanosina; 8-oxoGuo: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina; 8-oxoGua: 8-idrossi-7,8-diidroguanina. ANOVA seguita dal test *post hoc* di Bonferroni.

3.4.5 Indicatori urinari di metilazione degli acidi nucleici

Per quanto riguarda i risultati inerenti agli indicatori di metilazione degli acidi nucleici, si osservavano differenze statisticamente significative per la 5-MeCyto e per la 7-MeGuo con concentrazioni rispettivamente maggiori ed inferiori nei campioni della sera rispetto a quelli della mattina successiva sia nel gruppo dei bambini di Milazzo (rispettivamente $p<0,0001$ e $p<0,0001$) che nei bambini di Nizza (rispettivamente $p=0,004$ e $p<0,0001$). I livelli urinari di 7-MeGua erano significativamente maggiori nei campioni della mattina rispetto a quelli della sera precedente sia nel gruppo di Milazzo ($p=0,032$) che in quello di Nizza ($p=0,033$), mentre per la 5-MeCyt si avevano delle concentrazioni significativamente maggiori nei campioni della sera rispetto a quelli della mattina successiva solo nel gruppo dei bambini di Nizza ($p=0,049$). Inoltre, vi erano differenze statisticamente significative anche nelle concentrazioni di O⁶-MeGua e di 5-

MeCyto con valori più alti nel gruppo dei bambini di Milazzo rispetto a quelli di Nizza per la O⁶-MeGua nei campioni della sera (p<0,0001) e in quelli della mattina successiva (p<0,0001) e per la 5-MeCyto solo nei campioni della sera (p=0,003). I livelli urinari di 7-MeGuo erano maggiori nel gruppo dei bambini di Nizza rispetto a quelli di Milazzo per entrambi i tempi di campionamento, rispettivamente p=0,006, per la sera, e p<0,0001, per la mattina. Gli altri indicatori non mostravano delle significatività statistiche (**Tabella 9**).

Indicatore	Milazzo	Milazzo	p	Nizza	Nizza	p	Milazzo vs Nizza	
	Sera	Mattina		Sera	Mattina		Sera p	Mattina p
1-MeGua (µg/g cr)	115 [2,36]	115 [1,93]	n.s.	107 [2,27]	120 [1,78]	n.s.	n.s.	n.s.
7-MeGua (µg/g cr)	4911 [2,23]	5477 [1,90]	0,032	5037 [1,87]	6051 [1,50]	0,033	n.s.	n.s.
O6-MeGua (µg/g cr)	10,4 [1,61]	10,2 [1,51]	n.s.	6,58 [1,71]	6,06 [1,93]	n.s.	<0,0001	<0,0001
7-MeGuo (µg/g cr)	48,5 [2,43]	63,0 [2,29]	<0,0001	73,6 [3,13]	148 [2,19]	<0,0001	0,006	<0,0001
5-MeCyto (µg/g cr)	72,4 [1,80]	48,5 [1,79]	<0,0001	54,2 [1,93]	43,8 [2,03]	0,004	0,003	n.s.
5-MeCyt (µg/g cr)	4,44 [3,67]	3,92 [3,21]	n.s.	4,19 [3,04]	3,31 [3,67]	0,049	n.s.	n.s.
5-MedCyt (µg/g cr)	7,03 [3,84]	6,20 [3,67]	n.s.	6,12 [2,65]	6,03 [2,28]	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 9. Concentrazioni degli indicatori urinari di metilazione degli acidi nucleici in base al momento del campionamento, sera e mattina, e al livello di urbanizzazione (Milazzo/Nizza); i dati sono espressi come media geometrica e deviazione standard geometrica.

Legenda: n.s.: non significativo; 1-MeGua: 1-MetilGuanina; 7-MeGua: 7-MetilGuanina; O6-MeGua: O6-MetilGuanina; 7MeGuo: 7-MetilGuanosina; 5MeCyto: 5-MetilCitosina; 5MeCyt: 5-MetilCitidina; 5MedCyt: 5-Metil-2'deossiCitidina. *t* di Student per dati appaiati per il confronto sera vs mattina, *t* di Student per dati indipendenti per il confronto Milazzo vs Nizza.

Successivamente, abbiamo stratificando i bambini del gruppo di Milazzo nei sottogruppi vicino/lontano la raffineria petrolchimica. Nei campioni della sera (**Tabella 10**) vi erano concentrazioni urinarie significativamente maggiori di O⁶-MeGua nel gruppo vicino rispetto a quelli della scuola di Nizza (p<0,0001), mentre la 7-MeGuo mostrava un andamento opposto con concentrazioni significativamente maggiori nei bambini di Nizza rispetto al gruppo “vicino” (p<0,0001). Per la 5-MeCyto si avevano concentrazioni significativamente maggiori sia nei

bambini del gruppo vicino ($p=0,018$) sia in quelli del gruppo lontano ($p=0,031$) rispetto ai bambini della scuola di Nizza.

Sera	Vicino alla raffineria	Lontano dalla raffineria	Nizza	Vicino vs Lontano	Vicino vs Nizza	Lontano vs Nizza
N	127	22	54	p	P	p
1-MeGua ($\mu\text{g/g cr}$)	112 [2,40]	132 [2,14]	107 [2,27]	n.s.	n.s.	n.s.
7-MeGua ($\mu\text{g/g cr}$)	4875 [2,27]	5118 [2,00]	50367 [1,87]	n.s.	n.s.	n.s.
O6-MeGua ($\mu\text{g/g cr}$)	10,8 [1,63]	8,72 [1,47]	6,58 [1,72]	n.s.	<0,0001	n.s.
7-MeGuo ($\mu\text{g/g cr}$)	47,9 [2,50]	51,7 [2,00]	73,6 [3,13]	n.s.	<0,0001	n.s.
5-MeCyto ($\mu\text{g/g cr}$)	71,2 [1,83]	80,1 [1,66]	54,2 [1,93]	n.s.	0,018	0,031
5-MeCyt ($\mu\text{g/g cr}$)	4,14 [3,51]	6,57 [3,78]	4,19 [3,03]	n.s.	n.s.	n.s.
5-MedCyt ($\mu\text{g/g cr}$)	6,96 [3,99]	7,44 [3,02]	6,12 [2,65]	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 10. Concentrazioni degli indicatori urinari di metilazione degli acidi nucleici in base alla stratificazione vicino/lontano la raffineria e Nizza nei campioni della sera; i dati sono espressi come media geometrica e deviazione standard geometrica.

Legenda: n.s.: non significativo; 1-MeGua: 1-MetilGuanina; 7-MeGua: 7-MetilGuanina; O6-MeGua: O6-MetilGuanina; 7-MeGuo: 7-MetilGuanosina; 5-MeCyto: 5-MetilCitosina; 5-MeCyt: 5-MetilCitidina; 5-MedCyt: 5-Metil-2'deossiCitidina. ANOVA seguita dal test *post hoc* di Bonferroni.

Nei campioni della mattina successiva (**Tabella 11**) vi erano differenze significative nelle concentrazioni di O⁶-MeGua e 7-MeGuo. In particolare i bambini frequentanti la scuola a Nizza mostravano dei valori di O⁶-MeGua significativamente più bassi sia rispetto al gruppo lontano ($p=0,031$) che al gruppo vicino ($p<0,0001$). Andamento opposto si osservava per la 7-MeGuo, in cui il gruppo di Nizza presentava concentrazioni urinarie maggiori di 7-MeGuo sia rispetto al gruppo lontano che rispetto al gruppo vicino (entrambi con $p<0,0001$). Dopo aver stratificato i bambini di Milazzo nei due gruppi vicino e lontano dalla raffineria, confrontando le concentrazioni delle basi metilate nei 2 campioni della sera e del mattina successivo per i composti 7-MeGua, O⁶-MeGua, 7-MeGuo e 5-MeCyto, i risultati rispecchiavano le differenze riscontrate prima della stratificazione, mentre la 5-MedCyt mostrava concentrazioni

significativamente maggiori nei campioni della sera rispetto a quelli della mattina successiva solo nel gruppo lontano.

Mattina	Vicino alla raffineria	Lontano dalla raffineria	Nizza	Vicino vs Lontano	Vicino vs Nizza	Lontano vs Nizza
N	127	22	54	p	p	p
1-MeGua ($\mu\text{g/g cr}$)	114 [1,94]	122 [1,92]	120 [1,78]	n.s.	n.s.	n.s.
7-MeGua ($\mu\text{g/g cr}$)	5545 [1,94]	5111 [1,72]	6051 [1,50]	n.s.	n.s.	n.s.
O6-MeGua ($\mu\text{g/g cr}$)	10,6 [1,52]	8,30 [1,38]	6,06 [1,94]	n.s.	<0,0001	0,031
7-MeGuo ($\mu\text{g/g cr}$)	62,8 [2,37]	63,8 [1,87]	148 [2,19]	n.s.	<0,0001	<0,0001
5-MeCyto ($\mu\text{g/g cr}$)	45,5 [1,83]	47,9 [1,57]	43,8 [2,02]	n.s.	n.s.	n.s.
5-MeCyt ($\mu\text{g/g cr}$)	3,72 [3,10]	5,32 [3,80]	3,31 [3,67]	n.s.	n.s.	n.s.
5-MedCyt ($\mu\text{g/g cr}$)	6,47 [3,89]	4,91 [2,41]	6,03 [2,28]	n.s.	n.s.	n.s.

Tabella 11. Concentrazioni degli indicatori urinari di metilazione degli acidi nucleici in base alla stratificazione vicino/lontano la raffineria e Nizza nei campioni della mattina; i dati sono espressi come media geometrica e deviazione standard geometrica.

Legenda: n.s.: non significativo; 1-MeGua: 1-MetilGuanina; 7-MeGua: 7-MetilGuanina; O6-MeGua: O6-MetilGuanina; 7-MeGuo: 7-MetilGuanosina; 5-MeCyto: 5-MetilCitosina; 5-MeCyt: 5-MetilCitidina; 5-MedCyt: 5-Metil-2'deossiCitidina. ANOVA seguita dal test *post hoc* di Bonferroni.

Successivamente abbiamo studiato le eventuali correlazione tra i diversi indicatori determinati nelle urine dei bambini del gruppo di Milazzo e di quelli del gruppo di Nizza, sia nei campioni della sera che in quelli della mattina successiva. Le concentrazioni di tutti gli indicatori sono state espresse in $\mu\text{g/L}$. Le correlazioni positive tra S-PMA e le basi ossidate quali la 8-oxodGuo e la 8-oxoGuo e tra S-PMA e le basi metilate quali O⁶-MeGua, 7-MeGuo e 5-MeCyto si osservavano sia nei campioni della sera che in quelli della mattina in entrambi i gruppi (Milazzo, Nizza), mentre la correlazione tra S-PMA e 7MeGua si osservava solo nel gruppo dei bambini di Nizza nei campioni della sera e della mattina. Per quanto riguarda il B-U, esso mostrava un comportamento differente sia in funzione del luogo che dei tempi di campionamento. Nello specifico, nel gruppo di Milazzo, campioni della sera, si osservavano delle correlazioni positive

con la cotinina e con la 5-MedCyt, mentre alla mattina correlava con numerosi indicatori, tra cui S-PMA, 8-oxoGuo, 1-MeGua, 7-MeGua, O⁶-MeGua, 7-MeGuo. Nel gruppo di Nizza invece le correlazioni si osservavano con la 8-oxodGuo e l'O⁶-MeGua, dei campioni della sera, e con la 5-MeCyt e con l'O⁶-MeGua, i campioni della mattina (dati non mostrati).

Inoltre, abbiamo osservato delle correlazioni fortemente significative tra l'indicatore di esposizione a benzene, l'S-PMA, e gli indicatori di danno agli acidi nucleici, in particolare 8oxodGuo, O⁶-MeGua e 7-MeGuo sia nei bambini frequentanti le scuole di Milazzo che nei bambini frequentanti la scuola di Nizza. E' stata utilizzata la regressione lineare multipla per valutare il ruolo degli indicatori di esposizione e di altri fattori, quali il sesso, la creatinina e la distanza dalla raffineria sull'escrezione degli indicatori di ossidazione e di metilazione agli acidi nucleici.

Nel modello di regressione multipla, le concentrazioni di tutti gli indicatori sono state espresse in concentrazione ($\mu\text{g/L}$) e non in funzione della creatinina. L'esposizione a fumo passivo, le concentrazioni di MTBE, B-U e *t,t*-MA sono state rimosse dal modello dopo aver verificato che non erano significativi per nessun indicatore di ossidazione o di metilazione degli acidi nucleici. In Tabella 12 si riportano i risultati della regressione lineare multipla a blocchi per i soli indicatori per cui il modello risultava significativo. In particolare, i risultati ottenuti mostravano che l'S-PMA, la creatinina e la distanza della scuola dalla raffineria si possono considerare fattori predittivi dell'escrezione di 8-oxodGuo, della 5-MeCyt e dell'O⁶-MeGua per entrambi i tempi di campionamento. Il valore del coefficiente di correlazione parziale (r^2_p) indica il contributo di ogni singolo fattore (creatinina, S-PMA e distanza dalla raffineria) sulla variabilità dell'escrezione totale per ciascuno dei tre metaboliti. I modelli mostravano un coefficiente di correlazione modificato (r^2_{adj}) che variava da 0,125 a 0,578 con una significatività statistica variabile da 0,010 a <0,0001 sia nei campioni della sera che in quelli della mattina successiva. Le concentrazioni urinarie di 8-oxodGuo e di O⁶-MeGua risultavano significativamente influenzate dalla creatinina, dal S-PMA e dalla distanza dalla raffineria sia considerando i campioni sia della

sera che quelli della mattina successiva, mentre le concentrazioni di 5-MeCyto risultavano significativamente influenzate dalla creatinina e dal S-PMA, ma non dalla distanza delle scuole dalla raffineria. La creatinina è risultata il fattore che influenza maggiormente l'escrezione urinaria della 8-oxodGua con valori di r^2_p del 54% per il modello sera e del 38% per il modello mattina, mentre per 5-MeCyto e O⁶-MeGua presentava dei valori di r^2_p compresi fra il 3% e il 27%. Per quanto riguarda le basi metilate, l'S-PMA presentava un valore r^2_p del 16% (modello sera) per la 5-MeCyto e 15,8% (modello mattina) per la O⁶-MeGua, mentre spiegava solo l'1% della variabilità di 8-oxodGua. Il fattore distanza dalla raffineria è risultato significativo solo per 8-oxodGua e O⁶-MeGua con valori di r^2_p compresi fra il 3% e il 10% (**Tabella 12**).

	8-oxodGua	5-MeCyto	O6-MeGua	8-oxodGua	5-MeCyto	O6-MeGua	8-oxodGua	5-MeCyto	O6-MeGua
Sera	β_{stand}	β_{stand}	β_{stand}	r^2_p	r^2_p	r^2_p	p	p	p
Costante	0,55	1,95	0,872	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Creatinina	0,72	0,243	0,446	0,544	0,027	0,268	<0,0001	0,009	<0,0001
S-PMA	0,131	0,237	0,186	0,011	0,161	0,024	0,019	0,002	0,005
Distanza dalla Raffineria	0,042	-	0,081	0,028	-	0,106	0,002	-	<0,0001
r^2_{adj} , p			-	0,578	0,18	0,389	<0,0001	0,009	<0,0001
Mattina									
Costante	0,473	1,845	0,892	-	-	-	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Creatinina	0,800	0,365	0,54	0,379	0,104	0,085	<0,0001	0,005	<0,0001
S-PMA	0,114	0,209	0,207	0,013	0,029	0,158	0,027	0,01	0,002
Distanza dalla Raffineria	0,063	-	0,105	0,068	-	0,094	<0,0001	-	<0,0001
r^2_{adj} , p			-	0,460	0,125	0,327	<0,0001	0,01	<0,0001

Tabella 12. Fattori predittivi dell'escrezione urinaria di indicatori di ossidazione e metilazione degli acidi nucleici (presi come variabili dipendenti) utilizzato il modello di regressione lineare a blocchi: $\log(\text{indicatore di effetto}) = \text{costante} + \text{Log}(\text{U-creatinina}) \times \beta_1 + \text{Log}(\text{SPMA}) \times \beta_2 + (\text{Distanza dalla raffineria}) \times \beta_3$. Per ciascuna variabile si riportano i valori delle costanti, dei coefficienti β standardizzati (β_n), dei coefficienti di correlazione parziali (r^2_p) e la significatività (p). Nell'ultima riga si riporta il coefficiente di correlazione modificato (r^2_{adj}) e la significatività (p) del modello completo.

Legenda: 8-oxodGua; 8-idrossi-2'-deossiguanosina; 5-MeCyto, 5-Metilcitosina; O⁶-MeGua, O6-MetilGuanina; S-PMA, acido S-fenilmercapturico.

3.5 DISCUSSIONE

Il benzene, un agente cancerogeno noto per l'uomo, è un inquinante ambientale ubiquitario, proveniente da diversi fonti quali emissioni industriali, gas di scarico delle autovetture, stazioni di rifornimento carburante ed esposizione a fumo di sigaretta sia attivo che passivo. Il meccanismo responsabile della tossicità del benzene non è ancora stato del tutto chiarito, è noto tuttavia che i prodotti del suo metabolismo determinano la generazione di radicali liberi dell'ossigeno in grado di indurre un danno ossidativo a livello delle basi azotate degli acidi nucleici, oltre che interferire nel controllo dell'espressione genetica mediante modificazioni epigenetiche (metilazione) di DNA ed RNA. Risulta pertanto importante effettuare anche un monitoraggio ambientale e biologico anche in soggetti non professionalmente esposti, esposti solitamente a concentrazioni basse di benzene. Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato che l'esposizione a basse dosi di benzene abbia un ruolo nell'insorgenza di neoplasie del sistema emolinfopoietico, e sembrerebbe che soggetti esposti a concentrazioni inferiori ad 1 ppm metabolizzino il benzene più efficientemente rispetto ai soggetti esposti a livelli superiori e, poiché la tossicità del benzene è dovuta ai suoi metaboliti, i rischi associati alla salute possono essere rilevanti anche in caso di esposizione a basse dosi.

Risulta quindi importante per caratterizzare l'esposizione a benzene riuscire ad individuare degli indicatori di effetto di danno precoce sia nei soggetti professionalmente esposti che nella popolazione generale.

Il primo studio italiano a tal riguardo è stato quello effettuato dal nostro gruppo, in collaborazione con l'Università La Sapienza di Roma, nella regione Lazio, in questo lavoro si è stata dimostrata una relazione dose-effetto tra *S-PMA* e *8oxodGuo* per valori di esposizione ambientali di benzene pari a 0,83 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ a Leonessa, 2,1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ a Cassino e 3,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ a Roma (Andreoli *et al.*, 2012).

Lo studio attuale ha confermato l'esistenza di questa relazione anche per valori di esposizioni a benzene ancora più bassi (media 0,45 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), misurati nella città di Milazzo. Questi nuovi dati

hanno permesso di completare la curva dose-effetto per esposizioni a basse concentrazioni di benzene (Figura 9).

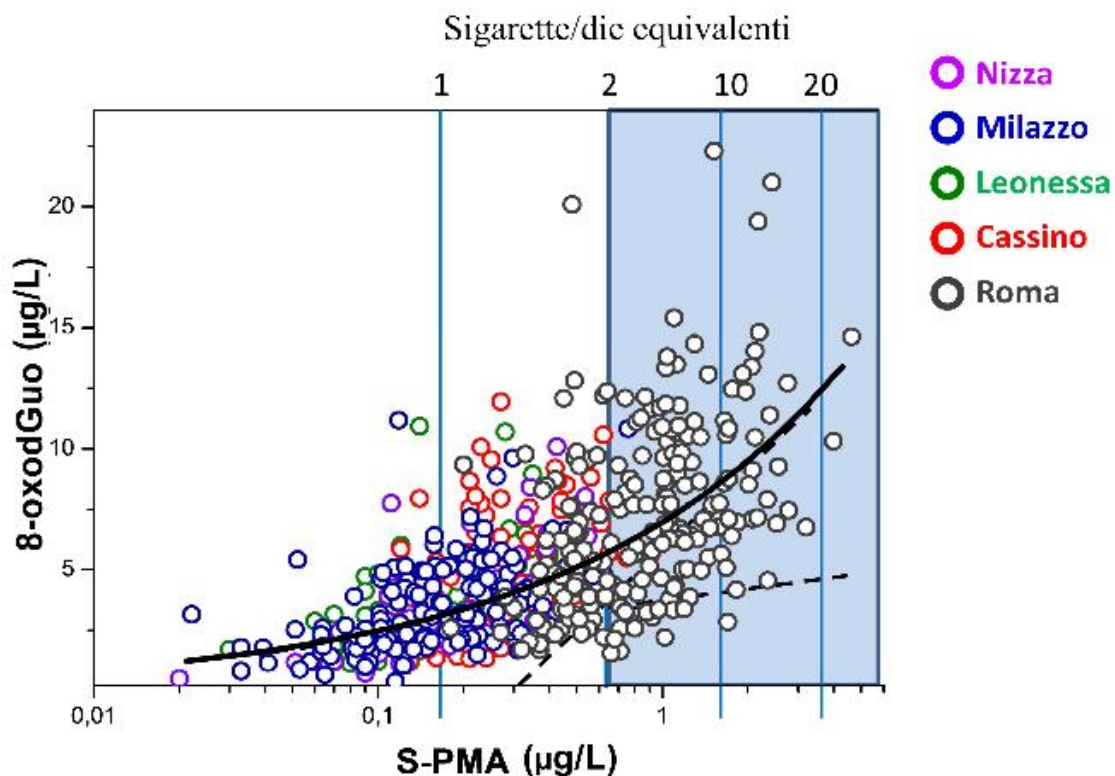


Figura 9. Curva dose-effetto tra le concentrazioni di S-PMA e 8-oxodGuo (Andreoli et al., 2012)

Tale curva mostra come i bambini frequentanti le scuole a Nizza, Milazzo e Leonessa si collocano tutti nella parte bassa della curva rispetto ai bambini frequentanti le scuole di Roma, localizzati nella parte alta della curva sopra al punto di flesso con livelli di S-PMA di $0,6 \mu\text{g/L}$ corrispondenti a circa $0,4 \mu\text{g/g}$ di creatinina. Dai risultati, è stata stimata un'esposizione ambientale pari a $9,09 \mu\text{g/m}^3$ di benzene, concentrazione che risulta ben al di sopra dei dati di benzene ambientale ricavati dalle postazioni fisse dell'ARPA. Queste differenze possono essere in parte spiegate dal fatto che i dati ARPA, essendo basati sul rilevamento ambientale da postazioni fisse, non riflettono l'effettiva esposizione durante la mobilità, inoltre, esiste un contributo all'esposizione derivante dal fumo passivo. Inoltre, sulla base del contenuto di benzene presente in ogni sigaretta è stato possibile estrapolare i dati di esposizione a benzene in termini di sigarette equivalenti. I nostri risultati evidenziano che i bambini residenti a Milazzo,

Nizza e Leonessa sono esposti a concentrazioni di benzene equivalenti a quelle assorbite fumando meno di 1 sigaretta al giorno rispetto ai bambini residenti a Roma che sono esposti a concentrazioni di benzene equivalenti a quelle assorbite fumando 10-20 sigarette al giorno.

Inoltre, nonostante i bassi livelli di benzene ambientali ($0,45 \mu\text{g}/\text{m}^3$), relativi a Milazzo, l'indicatore di dose (S-PMA) e l'indicatore di effetto (8-oxoGuo) sono risultati abbastanza sensibili nel discriminare il gruppo dei bambini di Milazzo e il gruppo dei bambini di Nizza, risultato, questo, indipendente dal momento del campionamento. Le analisi di regressione lineare multipla hanno evidenziato che l'escrezione urinaria di 8-oxoGuo è influenzata dall'S-PMA, dalla distanza dalla raffineria e dalla creatinina urinaria. Inoltre, come visto nello studio di Roma, anche in questo lavoro, è stata confermata la correlazione positiva tra le concentrazioni urinarie di S-PMA e quelle di 8-oxoGuo, forma derivante dall'ossidazione dell'RNA, indipendentemente dal tempo di campionamento e dal livello di urbanizzazione.

Per quanto riguarda la quantificazione dei livelli di MTBE-U i risultati ottenuti nello studio evidenziavano che le concentrazioni di MTBE erano statisticamente maggiori nelle urine dei bambini residenti a Milazzo rispetto a quelli residenti a Nizza sia alla sera ($p=0,031$) che al mattino seguente ($p=0,041$), risultato da attribuire al maggiore traffico veicolare di Milazzo rispetto a Nizza, confermando il suo ruolo quale indicatore di traffico veicolare. Valutando inoltre le concentrazioni di MTBE-U nel gruppo dei bambini con distretti scolastici vicini alla raffineria rispetto al gruppo dei bambini di Nizza, sia per i campioni della sera che per i campioni della mattina, le concentrazioni di MTBE erano statisticamente significativi nel gruppo vicino. Tale risultato è da attribuire molto probabilmente al maggior traffico veicolare nelle vicinanze della raffineria, dovute alla presenza di strade a scorrimento veloce.

Il B-U mostra invece un comportamento dipendente al tempo di campionamento. Nel gruppo dei bambini di Milazzo, per i campioni della sera correla solo con la cotinina mentre per i campioni del mattino correla positivamente con diversi indicatori tra cui l'S-PMA e l'8-oxoGuo. Da questi risultati possiamo dedurre che alla sera prima di andare a dormire i bambini siano esposti a

concentrazioni di benzene differenti da bambino a bambino in quanto dipendenti da diversi fattori tra cui il luogo di abitazione e gli stili di vita dei familiari. Al mattino invece si può supporre che la principale fonte di esposizione a benzene sia l'aria respirata durante la notte che è comune a tutti i soggetti. Questo diverso comportamento del B-U è probabilmente dovuto alla breve emivita dello stesso (circa due ore), caratteristica che rende questo indicatore estremamente sensibile alle variazioni di dose a cui si è esposti nel breve periodo, ma scarsamente correlato a metaboliti con emivita più lunga che invece meglio descrivono esposizioni mediate nel tempo.

Per quanto riguarda le basi metilate degli acidi nucleici, l'O⁶-MeGua, la 5-MeCyt e la 5-MeCyt sono risultate significativamente correlate con l'8-oxodGuo sia nei campioni della sera che in quelli del mattino, indipendentemente dal grado di urbanizzazione e industrializzazione. Nel nostro studio, abbiamo osservato un andamento dei livelli delle basi metilate prodotte in forma libera nelle urine dipendente sia dal grado di urbanizzazione/industrializzazione che dal tempo di campionamento. Per quanto riguarda il grado di urbanizzazione, sono state riscontrate concentrazioni urinarie di O⁶-MeGua e di 5-MeCyt più alte a Milazzo rispetto a Nizza, analogamente a quanto osservate per l'S-PMA e l'8-oxodGuo; mentre per la 7-MeGuo le concentrazioni urinarie dei bambini frequentanti le scuole di Milazzo sono significativamente più basse rispetto a quelle dei bambini di Nizza. Inoltre, gli andamenti opposti si mantengono significativi anche dopo la suddivisione Vicino/Lontano la raffineria per i bambini di Milazzo in entrambi i tempi di campionamento tranne che per la 5-MeCyt, la cui differenza rimane significativa solo per le urine della sera. È importante osservare che la metilazione delle basi libere aumenta all'aumentare del grado di urbanizzazione, facendo ipotizzare o ad un aumento della demetilazione spontanea o ad una attivazione dei sistemi enzimatici di rimozione della metilazione. Per quanto riguarda la forma derivante dall'RNA, che fisiologicamente si forma per aumentarne la stabilità e ridurre la degradabilità, diminuisce all'aumentare del grado di urbanizzazione/industrializzazione.

L'aumento della concentrazione urinaria di O⁶-MeGua in funzione del livello di urbanizzazione è associata ad una maggior esposizione ad agenti alchilanti, e per quanto riguarda il tempo di campionamento, la 7-MeGua e la 7-MeGuo, evidenziano concentrazioni significativamente più basse nelle urine della sera rispetto a quelle del mattino, andamento opposto per la 5-MeCyto e la 5-MeCyt. In uno studio precedente sulle basi ossidate, determinate nelle urine di soggetti adulti sani, per gli indicatori di danno ossidativo agli acidi nucleici è stata esclusa l'esistenza di un ritmo circadiano (Andreoli *et al.*, 2010). Dal momento che le differenze osservate tra i campioni della sera e quelli del mattino successivo sono indipendenti dal grado di urbanizzazione e che in letteratura non sono riportati studi analoghi sui bambini, per una interpretazione univoca di questi risultati, sono necessari ulteriori approfondimenti. Dalle correlazioni effettuate è emerso come la maggior parte delle basi metilate siano correlate positivamente con l'S-PMA sia nei campioni della sera che in quelli del mattino seguente e in entrambi i gruppi dei bambini, sia quelli di Milazzo che quelli di Nizza. In particolare a Milazzo, dove i livelli di inquinamento e le fonti di esposizione ad agenti metilanti sono maggiori rispetto a Nizza, l'O⁶-MeGua e la 5-MeCyto correlano significativamente anche con *t,t*-MA e l'O⁶-MeGua correla anche con la cotinina, indicatore di fumo passivo.

Applicando dei modelli di regressione lineare multipla, è stato osservato che l'escrezione urinaria di 5-MeCyto è influenzata dalle concentrazioni di S-PMA e di creatinina mentre la concentrazione di O⁶-MeGua è dipendente anche dalla distanza dalla raffineria. Pertanto, dai risultati ottenuti possiamo ipotizzare che anche le basi metilate potrebbero essere utilizzate come indicatori di effetto e quindi di danno agli acidi nucleici indotto dall'esposizione ad agenti inquinanti, tra cui il benzene. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per confermare tali correlazioni e per meglio comprenderne il loro significato.

3.6 CONCLUSIONI

Questo lavoro ha dimostrato come le concentrazioni urinarie dell'*S*-PMA e 8-oxodGuo dipendono dal livello di urbanizzazione e dal momento del campionamento. Inoltre, le correlazioni positive e significative tra *S*-PMA e la maggior parte delle basi ossidate e metilate del DNA si mantengono sia nel campionamento della sera che in quello del mattino successivo sia a Milazzo che a Nizza.

Inoltre, è stato possibile integrare i risultati di questo studio con quelli dello studio precedente effettuato nella regione Lazio, potendo in questo modo completare la curva dose-effetto per esposizioni a più basse concentrazioni di benzene ambientale. Modelli di regressione lineare multipla hanno confermato come l'escrezione di 8-oxodGuo oltre che dalla creatinina è influenzata anche dal *S*-PMA, ovvero dall'esposizione a benzene e dalla distanza dalla raffineria.

Per di più, l'aspetto innovativo di questo studio è rappresentato dal fatto che per la prima volta viene indagata una possibile relazione tra alcuni indicatori di danno agli acidi nucleici e l'esposizione a basse dosi di benzene. I nostri risultati hanno mostrato che l'*O*⁶-MeGua e la 7-MeGuo dipendono sia dal livello di urbanizzazione che dal momento del campionamento, mentre la 5-MeCyto è influenzata solo dal momento del campionamento. Inoltre, abbiamo visto come sia le basi metilate come anche le basi ossidate correlano positivamente con l'*S*-PMA e da modelli di regressione lineare multipla è stato evidenziato che l'escrezione urinaria dell'*O*⁶-MeGua è influenzata dalla distanza dalla raffineria e dall'*S*-PMA mentre quella della 5-MeCyto è influenzata solo dall'*S*-PMA.

Possiamo quindi concludere affermando che i risultati ottenuti suggeriscono un possibile impiego delle basi ossidate urinarie e anche delle basi metilate come indicatori di effetto per esposizione a basse dosi di benzene.

CAPITOLO 4. MODELLI *IN VITRO* PER LO STUDIO DELLA TOSSICITÀ DEL VINILCICLOESENE

4.1 INTRODUZIONE

Il 4-vinilcicloesene (VCH) è un composto organico di sintesi ottenuto generalmente come sottoprodotto di reazione e non direttamente come prodotto di consumo. A livello industriale si forma dalla dimerizzazione del 1,3-butadiene, una reazione che avviene ad alte temperature e alte pressioni (Huff, 2001) (**Figura 10**).

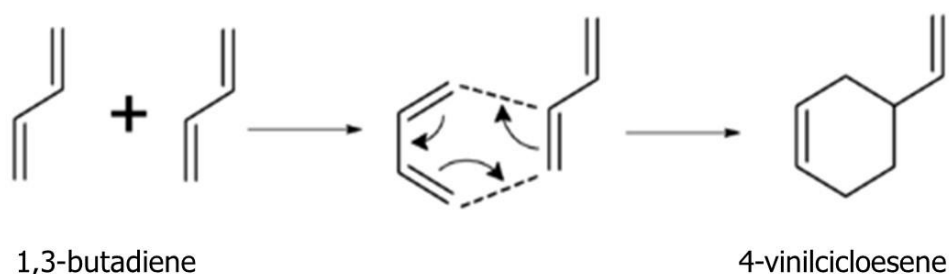


Figura 10. Reazione di sintesi del VCH dalla dimerizzazione del 1,3-butadiene.

Inoltre, si ottiene come sottoprodotto dalla raffinazione del 1,3-butadiene e dal processo di produzione di acido dodecandioico e di vinilnorbornene (Huff, 2001).

In letteratura vengono riportati bassi livelli di esposizione occupazionale a VCH durante la produzione e l'uso di 1,3-butadiene (Alimardnov *et al.*, 2013).

Il VCH viene utilizzato per la produzione di vinilcicloesene diossido, come diluente nelle resine epossidiche, come precursore per plastificanti in etilcicloesil metanolo, come intermedio per la fabbricazione di insetticidi tiocianati oppure come ossidante. È stato utilizzato, anche, per la produzione di ritardanti di fiamma, nella produzione di poliolefine e come solvente e nella sintesi di composti chimici quali il diepossido (IARC, 1994; Huff, 2001).

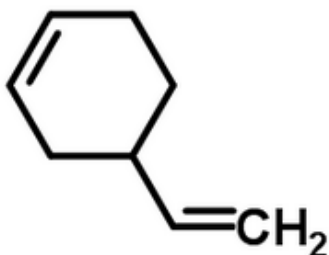
Viene ottenuto come sottoprodotto nella sintesi di prodotti chimici inorganici e organici, nella lavorazione e nella trasformazione delle resine sintetiche e dei materiali polimerici termoplastici

e termoindurenti (IARC, 1994) e nella fabbricazione della gomma greggia e sintetica. Per esempio, la più importante gomma sintetica per la produzione di pavimenti è la gomma SRB, *Styrene Butadiene Rubber*, ottenuta per polimerizzazione di butadiene e stirene usati in proporzione di 3:1. I prodotti finiti emettono sostanze tra cui il VCH e il 4-fenilcicloesene (IARC, 1994; IUCLID, 2006).

Inoltre, il VCH è classificato dalla IARC (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) come possibile cancerogeno per l'uomo (IARC, 1994) e l'ACGIH ha proposto un TLV-TWA (*8-h time-weighted average threshold limit value*) pari a 0.022 mg/m³ ovvero 0.1 ppm (ACGIH, 2001).

4.1.1 Proprietà chimico-fisiche del VCH

- Struttura molecolare:



- Formula molecolare: C₈H₁₂
- Liquido incolore
- Peso molecolare: 108.18 g/mol
- Punto di fusione: -108.9°C
- Punto di ebollizione: 128.9°C
- Densità relativa: 0.8299 g/cm³
- Solubilità in acqua: 50 mg/L a 25°C
- Tensione di vapore, kPa a 38°C: 3.43
- Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua espresso come Log P_{ow}: 3.93

4.1.2 Metabolismo e tossicocinetica

Il VCH viene ossidato dall'azione del citocromo P450, 2A e 2B, a isomeri monoepossidi quali il vinilcicloesene 1,2-monoepossido (1,2-VCHME) e vinilcicloesene 7,8-monoepossido (7,8-VCHME) come riportato in figura 11 (Smith *et al.*, 1990; Rajapaksa *et al.*, 2007). Entrambi gli epossidi sono ulteriormente ossidati al diepossido (VCD), una reazione in competizione con la reazione di idrolisi per la formazione del corrispondente diolo (Smith *et al.*, 1990; Chiappe *et al.*, 2001; Cannady *et al.*, 2003; Rajapaksa *et al.*, 2007). Il quadro metabolico è molto più complicato rispetto a quanto riportato nella figura in cui vengono riportati solo i metaboliti di fase I, di conseguenza risulta fondamentale lo studio anche dei metaboliti di fase II. Inoltre, sarebbe interessante considerare la stereochimica dei prodotti derivanti dall'ossidazione e/o dall'idrolisi, perché studiando il processo di biotrasformazione di questi composti si può determinare anche la loro tossicità.

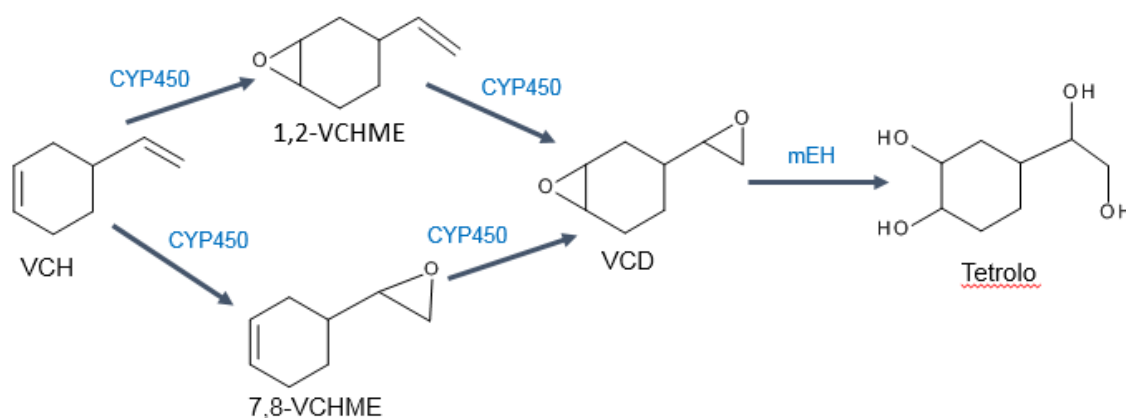


Figura 11: Metabolismo del VCH: bioattivazione attraverso la via del citocromo P450 (CYP450) negli epossidi 1,2-VCHME e 7,8-VCHME e successiva ossidazione al diepossido (VCD), che per azione dell'epossidasi microsomiale (mEH) porta la formazione del tetrolo.

Alcuni studi, *in vitro*, valutando la cinetica degli enzimi, hanno dimostrato che i processi che portano alla formazione degli epossidi e del VCD sono generalmente più attivi nel fegato e nel polmone dei topi rispetto ai ratti (Keller *et al.*, 1997; Kappeler *et al.*, 2012). L'idrolisi del VCD nel ratto e nel topo si è osservata nel fegato, polmoni e ovaie (Keller *et al.*, 1997). Ulteriori studi

in vitro hanno evidenziato come alcune frazioni microsomiali epatiche umane metabolizzano il VCH in 1,2- e 7,8-VCHME, con una produzione predominante del'1,2-VCHME (Smith *et al.*, 1991).

Ulteriori studi, utilizzando gli animali, hanno dimostrato che in seguito alla somministrazione di una singola dose di VCH pari a 400 mg/kg di peso corporeo, il 95% della dose viene eliminato dopo 24 ore nei topi mentre nei ratti dopo 48 ore. L'eliminazione avviene principalmente attraverso le urine (50-60% della dose), e attraverso l'aria espirata (30-40% della dose) (Smith *et al.*, 1990; IARC, 1994; ACGIH, 2001). La radioattività totale dei tessuti, nei topi risultava essere minore dell'1% della dose somministrazione dopo 24 ore e del 3.4% per i ratti dopo 48 ore (ACGIH, 2001). Inoltre, la concentrazione di VCH risultava essere più alta nel tessuto adiposo, di circa dieci volte superiore a quello dei tessuti del fegato, della pelle e delle ovaie (IARC, 1994).

Diversi studi hanno verificato che uno degli organi bersagli del VCH è l'ovaio, in cui il VCH viene metabolizzato (bioattivato) in VCD per azione del CYP450 attraverso i membri della famiglia CYP 2E1 (Cannady *et al.*, 2003; Rajapaksa *et al.*, 2007). In particolare, i topi che non esprimevano il CYP 2E1 avevano una perdita minore di follicoli rispetto ai topi *wilde-type* (Rajapaksa *et al.*, 2007), suggerendo un coinvolgimento del CYP 2E1 nella bioattivazione del VCH. Inoltre, il VCD può essere detossificato a livello dell'ovaio attraverso l'azione dell'eossido idrolasi microsomiale (mEH) per portare alla formazione del tetolo (Cannady *et al.*, 2002; Keating *et al.*, 2008; Bhattacharya *et al.*, 2012). In seguito al trattamento con il VCH si è evidenziato un aumento di mRNA e proteine per il mEH sia *in vivo* che *in vitro*. Inoltre, a seguito dell'inibizione *in vitro* del mEH e utilizzando il cicloesene ossido in presenza di VCD, risultava più importante la perdita dei follicoli rispetto alle ovaie trattate solo con il VCD evidenziando così il ruolo di disintossicazione a livello delle ovaie da parte del mEH durante l'esposizione a VCD (Bhattacharya *et al.*, 2012).

Un altro ruolo importante viene svolto dal glutathione (GSH). Il GSH è un antiossidante che protegge le cellule contro lo stress ossidativo e contro composti elettrofilici (DeLeve e Kaplowitz, 1991). Le sue due principali funzioni sono quelle di coniugarsi ai composti elettrofilici tramite enzimi come le glutathione S-transferasi, comportandone una più rapida escrezione dal corpo, e di ridurre gli intermedi reattivi dell'ossigeno tramite il coinvolgimento delle glutathione perossidasi (DeLeve & Kaplowitz, 1991). Il glutathione S-transferasi (GST) fa parte di una famiglia di enzimi che catalizzano la coniugazione del glutathione con gli xenobiotici, ed è stato visto che l'ovaio è in grado di sintetizzare il glutathione (DeLeve & Kaplowitz, 1991). In uno studio del 2008, è stato visto che l'RNA che codifica per le isoforme GST pi (GSTp) e GST mu (GSTm) venga aumentato in risposta all'esposizione di vinilcicloesene dieossido, in colture ovariche (Keating *et al.*, 2008).

Ulteriori studi hanno visto il coinvolgimento del fosfatidilinositolo 3-chinasi (P13K), una famiglia di enzimi coinvolti in diverse funzioni cellulari quali la proliferazione, la differenziazione, la motilità e la sopravvivenza intracellulare (Vivanco & Sawyers, 2002) meccanismi questi coinvolti anche nello sviluppo del cancro. A livello dell'ovaio, la via di segnalazione P13K gioca un ruolo importante nel mantenimento della vitalità dei follicoli primordiali, dirigendone la crescita (Zhao *et al.*, 2015). È stato osservato, che durante l'ovotossicità indotta dal VCD, si hanno delle perdite di segnalazione da parte di P13K (Keating *et al.*, 2011; Bhattacharya *et al.*, 2012).

4.1.3 Studi di esposizione *in vivo*

4.1.3.1 Esposizione acuta, subcronica e cronica

Gli studi sugli effetti di una esposizione acuta, subcronica e cronica da VCH derivano da svariati studi condotti sugli animali, prevalentemente topi e ratti (**Tabella 13**).

ESPOSIZIONE ACUTA					
Analita	Dose	Tempo	Animali	Sesso	Riferimento
VCH	400 mg/kg	-	Ratti Fischer 344 Topi B6C3F1	F	Smith <i>et al.</i> , 1990
VCH	400 mg/kg	-	Ratti Fischer 344 Topi B6C3F1	F	ACGIH 1995
VCH	400 mg/kg	-	Ratti Fischer 344 Topi B6C3F1	F	IARC 1994
ESPOSIZIONE CRONICA					
Analita	Dose	Tempo	Animali	Sesso	Riferimento
VCH, VCD, 1,2-VCHME, 7,8-VCHME	0.07-7.4 mmol/kg	30 giorni	Ratti Fischer 344	F	Smith <i>et al.</i> , 1990
VCH	6 mmol/kg	30 giorni	Topi B6C3F1	F	Hosser <i>et al.</i> , 1993
VCH	0-100-250-500 mg/kg	14 settimane	Topi Swiss CD-1	F	Grizzle <i>et al.</i> , 1994
VCH VCD	2.5 ml/kg 320 mg/kg	30 giorni	Topi B6C3F1	M F	Stephen <i>et al.</i> , 1995
VCD	80 mg/kg	15 giorni	Ratti Fischer 344	F	Smith <i>et al.</i> , 1990
VCD	160 mg/kg	20 giorni	Topi B6C3F1	F	Jennifer <i>et al.</i> , 2013
VCD	80 mg/kg	6 settimane	Ratti Fischer 344	F	Li <i>et al.</i> , 2014
VCD	80 mg/kg	14 giorni	Ratti Fischer 344	F	Lei Z. <i>et al.</i> , 2015
VCD	160 mg/kg	15 giorni	Topi B6C3F1	F	Hassanet <i>et al.</i> , 2015
VCD	80 mg/kg	15 giorni	Topi B6C3F1	F	Chen <i>et al.</i> , 2015

Tabella 13: Studi *in vivo* di esposizione acuta e cronica a VCH e ai suoi metaboliti.

Nel topo, la comparsa del monoepossido (1,2-VCHME) nel sangue avviene dopo 0.5 a 6 ore dalla somministrazione, nei ratti la concentrazione ematica del monoepossido risultava essere inferiore ai 2.5 nmol/ml in ogni momento in cui veniva esaminato tale dato. Per quanto riguarda il metabolita 7,8-VCHME non era presente né nei topi né nei ratti. Inoltre, da questo studio risultava che il tasso di eossidazione nel topo nella formazione del 1,2-VCHME è 6.5 volte maggiore rispetto al ratto. Questo risultato, in parte, potrebbe spiegare la maggiore incidenza di

tumori ovarici VCH-indotti nei topi rispetto ai ratti (Smith *et al.*, 1990; ACGIH, 2001; IARC, 1994).

In un altro lavoro, esponevano dieci ratti Spague-Dawley, maschi e femmine, e topi B6C3F₁ a VCH per sei ore al giorno, per cinque giorni alla settimana, per un totale di tredici settimane, ad una esposizione per inalazione (Dyer *et al.*, 2013). Quello che hanno osservato è che alle alti dosi, i maschi e otto femmine su dieci, sono morti prima del termine dell'esperimento, entro i primi dodici giorni di esposizione. Per i maschi, vi erano dei risultati statisticamente significati per l'incidenza a letargia, con un'esposizione al VCH di 250 ppm, letargia osservata in entrambi i sessi a 1500 ppm. Una riduzione di peso è stato osservato, in entrambi i sessi, a una esposizione di 1000 e 1500 ppm. E' stato valutato il peso dei reni, e nei maschi era aumentato in modo significativo. Inoltre, nelle femmine è stata osservata una atrofia ovarica con una esposizione di 1000 ppm (ACGIH, 2001; Bevan *et al.*, 1996).

Alcuni studi condotti per valutare gli effetti di tale xenobiotico in seguito ad una esposizione cronica, con una somministrazione di 30 giorni, di VCH e dei suoi metaboliti in topi B6C3F₁ e ratti F344, hanno osservato che tale esposizione comportava induzione di tumori ovarici (Smith *et al.*, 1990). Inoltre, si osservava anche una drastica riduzione del numero dei follicoli primordiali e primari (Smith *et al.*, 1990; Hoosper *et al.*, 1993; Hoosper *et al.*, 1995). Inoltre, altri effetti evidenti sono stati una maggiore incidenza di mortalità nei maschi e in entrambi i sessi vi era una maggiore incidenza di iperplasia epiteliale del prestomaco. Nei topi, la sopravvivenza era notevolmente diminuita in entrambi i sessi alle alte dosi di esposizione, con anomalie a livello dello stomaco, quali ulcere, infiammazione, iperplasia dell'epitelio del prestomaco. L'esame istopatologico ha evidenziato un aumento significativo della incidenza di congestione epatica centrolobulare e atrofia della polpa rossa della milza nei maschi alle alte dosi, con una congestione della ghiandola del surrene e alterazioni della corteccia, nelle femmine si è osservata un cambiamento a livello ovarico, riguardanti le cellule tubolari, le cellule della granulosa (Stadler *et al.*, 1994).

4.1.3.2 Cancerogenicità e Genotossicità

Gli studi *in vivo* sulla cancerogenicità del VCH hanno evidenziato la comparsa di tumori ovarici in topi e ratti di sesso femminile anche se con risultati a volte poco chiari e complicati a causa della scarsa sopravvivenza degli animali (Smith *et al.*, 1990; Hoosper *et al.*, 1993). E' stato inoltre osservato un ruolo del VCH nel provocare la perdita selettiva dei piccoli follicoli preantali (**Figura 12**) (IARC, 1994) (primordiale e primario), accelerando il naturale processo di atresia (apoptosi) nei follicoli di topo, ma non nel ratto (Hu *et al.*, 2001; Devince *et al.*, 2002; Hassah *et al.*, 2015), a differenza del metabolita VCD che risulta essere ovotossico in entrambe le specie, sia nei topi che nei ratti (Smith *et al.*, 1990; Hoosper *et al.*, 1993; IARC, 1994; Spinger *et al.*, 1996). La perdita dei follicoli inizierebbe intorno al sesto giorno di trattamento con il VCH (Flaws *et al.*, 1994 ; Keating *et al.*, 2009).

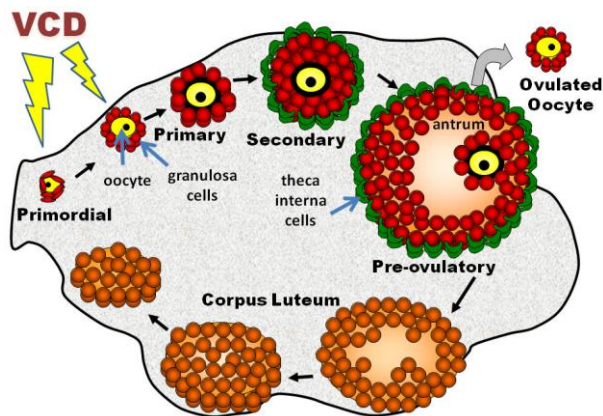


Figura 12. Azione ovotossica del VCD, metabolita del VCH, a livello del follicolo primordiale e primario.

Di conseguenza, gli agenti chimici che distruggono i follicoli ovarici sono di potenziale preoccupazione perché l'ovaio contiene un numero finito di follicoli, quindi una distruzione accelerata dei follicoli nelle ovaie porterebbe ad una insufficienza ovarica prematura (Mayer *et al.*, 2002). Questo è un aspetto importante da valutare e controllare in quanto una menopausa precoce, nelle donne esposte, comporta un maggiore rischio per l'insorgenza di diverse malattie

che possono manifestarsi dopo la menopausa, quali malattie cardiache e l'osteoporosi (Hooser *et al.*, 1994).

Non vi sono chiare spiegazioni sui meccanismi in cui il VCH porterebbe a degli effetti cancerogeni, e anche se non vi sono stati risultati positivi per i test di genotossicità del VCH, un meccanismo genotossico è probabile, in quanto alcuni dei metaboliti che si vengono a formare sono mutageni. Il VCD è risultato mutageno in *Salmonella typhimurium* e in *Saccharomyces cerevisia* (IARC 1994). Nelle cellule di mammifero in coltura, come le V79 (una linea cellulare polmonare derivato dal Criceto cinese), CHO (una linea cellulare ovarica di Criceto cinese), e una linea cellulare di linfoma di topo, si è osservata, in seguito al trattamento con il VCH, una mutazione inversa, quali lo scambio di cromatidi fratelli e aberrazioni cromosomiche (IARC, 1994).

4.1.3.3 Effetti a livello riproduttivo e dello sviluppo

In uno studio sulla riproduzione, sono stati utilizzati topi CD-1, maschi e femmine, a cui veniva somministrato il VCH a dosi di 0, 100, 250 o 500 mg/kg di peso corporeo al giorno, per 16 settimane prima della riproduzione. Successivamente, sono stati trattati i cuccioli a 21 giorni dallo svezzamento con dosi di 0 o 500 mg/kg su peso corporeo, trattamento effettuato per 7-8 settimane prima del concepimento della generazione successiva (Grizzle *et al.*, 1994). I risultati di tale studio hanno evidenziato che alle dosi di esposizione a VCH pari a 500 mg/kg di peso corporeo/giorno, non vi fossero effetti sulla capacità riproduttiva della prima generazioni e nemmeno sulla seconda generazione (Grizzle *et al.*, 1994). Quello che si osservava era una tossicità ovarica evidente con dei risultati statisticamente significativi nella riduzione del numero dei follicoli ovarici primordiali e primari, e nei maschi si è evidenziato una riduzione statisticamente significativa della motilità degli spermatozoi nella prima generazione (Grizzle *et al.*, 1994).

Ulteriori studi hanno dimostrato che i topi B6C3F1 femmine sono più sensibili delle femmine di ratto F344 per quanto riguarda la tossicità ovarica (Smith *et al.*, 1990; Berger *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2014; Tracey *et al.*, 2014). Entrambe le specie sono risultate sensibili alla somministrazione del metabolita VCD, con valori di ED₅₀ nel range di 0.2-1.4 mmol/kg di peso corporeo al giorno. Ulteriori indagini sulla struttura e sulla attività dei metaboliti del VCH hanno evidenziato come la formazione del VCD sia fondamentale per l'induzione della tossicità ovarica in seguito all'esposizione del VCH nel topo (Doerr *et al.*, 1996), effetti che si verificano senza delle alterazioni dei livelli degli ormoni follicolo stimolanti a livello del plasma (Hooser *et al.*, 1993).

4.1.4 Biopersistenza del VCH

Il VCH non viene biodegradato velocemente: test effettuati in condizioni aerobiche hanno evidenziato l'assenza di biodegradazione dopo 28 giorni, osservando che per la biodegradazione erano richieste più settimane (*Chemicals Inspection e Testing Institute*, 1992).

Il VCH avendo una tensione di vapore di 15.7 mmHg a 25°C, è altamente volatile nell'aria, quindi, si può degradare rapidamente attraverso delle reazioni con l'ozono (O₃). Misure sperimentali hanno confermato che il VCH riesce a reagire con l'ozono (Weschler, 1992) attraverso reazioni in cui l'ossigeno portava alla formazione di radicali idrossile (OH⁻).

La stabilità in acqua, per il VCH, non è stata valutata quantitativamente, perché non contiene gruppi funzionale sensibili all'idrolisi. La struttura è quella di un idrocarburo aliciclico, pertanto l'idrolisi non dovrebbe contribuire in modo significativo alla rimozione del VCH dall'ambiente (in condizioni di pH neutro).

4.1.5 Esposizione professionale dei lavoratori

La produzione industriale di 4-VCH avviene per lo più in linea chiusa e, di conseguenza, le esposizioni dei lavoratori sono facilmente controllate e/o impedito. Nonostante ciò, i lavoratori possono essere esposti alle emissioni fugitive dalle linee di produzione. Per questi motivi non sono riportate stime affidabili sul numero di lavoratori che potrebbero essere esposti a 4-VCH

durante la sua produzione e/o uso. Dai dati di letteratura (NTP, 1991) si evince che le esposizioni professionali durante le diverse fasi di lavorazione, calcolate come TLV-TWA, sono in genere al di sotto dello 0.1 ppm, valore limite proposto dall'ACGIH. Tuttavia, è stato riportato un caso dalla ACGIH di alcuni lavoratori russi del settore della gomma, esposti per inalazione a VCH a delle concentrazioni medie che vanno dai 271 ai 542 ml/m³, e con picchi di esposizioni fino a delle concentrazioni di 677 ml/m³. Questa esposizione ha comportato cheratite, rinite, forti mal di testa, ipotonia, leucopenia, linfocitosi e neutrofilia (ACGIH, 1991).

I lavoratori possono inoltre essere esposti indirettamente a VCH durante il processo industriale di vulcanizzazione di stirene-butadiene e durante la produzione di gomma di polibutadiene, materia prima utilizzata per la produzione di pneumatici, soles di scarpe, tubi flessibili, cinghie di trasmissione, fili e cavi, e guarnizioni. L'esposizione indiretta a 4-VCH avviene anche come conseguenza di emissioni passive da polimeri di stirene-butadiene e adesivi in lattice usati per la fabbricazione di tappeti e da materiali laminati utilizzati in edilizia. La natura e l'entità dell'esposizione dipendono in gran parte dalle specifiche condizioni di lavoro, anche se i dati di letteratura (Collins *et al.*, 1987) riportano valori inferiori al TLV-TWA.

L'esposizione a VCH extra-lavorativa, può essere anche il risultato di emissioni passive di prodotti finiti quali tappeti e materiali laminati utilizzati in edilizia dove vengono utilizzati polimeri a base di stirene-butadiene. Alcuni studi di monitoraggio ambientale hanno evidenziato concentrazioni di 4-VCH nell'aria dell'ordine dei ppb, con una tendenza a diminuire nell'arco di qualche giorno (Hodgson *et al.*, 1993).

4.2 OBIETTIVO DELLO STUDIO

Quando ci si propone di introdurre nuove sostanze o nuove tecnologie nell'uso quotidiano, bisogna partire dal presupposto che esse possano avere un effetto nocivo sulla salute dell'uomo. Perciò, prima di commercializzare e utilizzare su larga scala tali sostanze è necessaria un'analisi preventiva dei potenziali effetti avversi e dei benefici che possono determinare alla salute dell'uomo e dell'ambiente in cui vive.

I potenziali danni per la salute, che vengono considerati comprendono quelli che possono ridurre le aspettative di vita, o compromettere le funzioni fisiologiche, quelli che potrebbero ridurre le capacità di resistenza ad altre sostanze tossiche o alle malattie e anche quei danni che potrebbero influire negativamente sulla funzione riproduttiva.

Sulla base di questi presupposti l'obiettivo dello studio consiste nel valutare la tossicità del VCH. Inizialmente *in vitro* abbiamo valutato gli effetti del VCH a livello di diverse linee cellulari. In particolare abbiamo indagato maggiormente eventuali effetti a livello della linea polmonare, in quanto il VCH essendo una molecola volatile, in seguito ad esposizione professionale, il primo organo bersaglio è rappresentato dal polmone; sulla linea epatica, per studiare meglio il metabolismo ed identificare i metaboliti di fase I e fase II, e infine abbiamo valutato anche gli effetti a livello delle linee testicolari per valutare eventuali effetti a livello riproduttivo. Inoltre, sempre *in vitro*, abbiamo valutato se vi fosse corrispondenza fra la concentrazione nominale e la concentrazione reale mediante analisi in gascromatografia.

Attualmente sono in corso gli studi *in vivo*, in cui abbiamo esposto i ratti a VCH, con l'obiettivo di approfondire il metabolismo e la cinetica di eliminazione del VCH, oltre che valutare gli organi bersaglio (dati non riportati).

Infine, l'obiettivo finale è rappresentato nel valutare l'esposizione professionale dei lavoratori e identificare e proporre degli indicatori di esposizione.

4.3 MATERIALI E METODI

4.3.1 Disegno sperimentale dello studio

Mediante un approccio *in vitro* abbiamo confrontato la tossicità del VCH con quella di altri due xenobiotici: il Vinilcicloesano e lo Stirene, scelti per l'analogia struttura chimica (**Figura 13**).

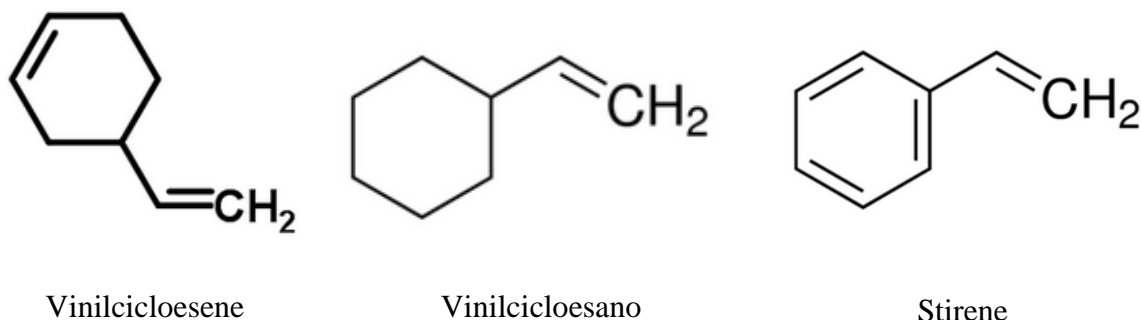


Figura 13. Struttura di Vinilcicloesene, Vinilcicloesano e Stirene.

Il VCH presenta due doppi legami, uno sulla catena laterale e uno a livello dell'anello, questo comporta la possibile formazione di due epossidi, mentre il Vinilcicloesano, avendo solo un doppio legame sulla catena laterale, può essere metabolizzato portando alla formazione di un solo epossido. Anche la via metabolica dello Stirene può determinare la formazione preferenziale di due epossidi, sulla catena laterale e sull'anello, ma con la perdita della sua aromaticità.

Lo Stirene è stato scelto anche in ragione delle numerose informazioni a disposizione in letteratura sul suo metabolismo e sui suoi meccanismi di tossicità, mentre poco o nulla si sa a proposito del Vinilcicloesano.

La classificazione di queste tre sostanze, sulla base della pericolosità è la seguente (**Tabella 14**):

Xenobiotico	R	TLV
VCH	R11-R36-R40-R62-R65-R52/R53 F, Xi, Xn, N	0,1ppm
Vinilcicloesano	R11-R36-R37-R38 F, Xi	Non indicato
Stirene	R10-R36/R38-R20 Xi, Xn	20ppm

Tabella 14. Fasi di rischio e valori TLV dei tre xenobiotici. (R-11: molto infiammabile; R-10: infiammabile ma non tale da avere il simbolo della fiamma; R-40: probabile cancerogeno di categoria 2; R-62: probabile effetto sulla riproduzione; R-65: tossico per aspirazione; R-36: irritante per la pelle; R-52/R-53: pericoloso per l'ambiente; F: infiammabile; Xi: irritante; Xn: nocivo; N: nocivo per l'ambiente).

E' stato perciò valutato l'effetto di questi tre xenobiotici in diverse linee cellulari per poter valutare gli effetti dose/risposta.

Le linee cellulari che abbiamo studiato in una prima fase erano le A549 (Cellule di adenoma alveolare umano), le HepG2 (Cellule di epatocarcinoma umano), le HL60 (Cellule di leucemia promielocitica umana), le SK-N-MC (Cellule di neuroepitelioma umano), le CHO-K1 (Cellule ovariche di criceto cinese, *cricetulus griseus*).

Per ogni linea cellulare e per ogni xenobiotico sono stati calcolati l'IC₅₀ e la Benchmark Dose per estrapolare la concentrazione (Dose Nominale) a cui esporre le cellule e valutarne gli effetti.

Infine tramite analisi in gascromatografia-spettrometria di massa è stata misurata nel tempo la concentrazione reale (Dose Reale) a cui le cellule vengono esposte durante gli esperimenti *in vitro*.

In una seconda fase del lavoro, abbiamo esposto a VCH altre linee cellulari, quali la linea cellulare del Sertoli immortalizzata murine, TM4, e la linea cellulare di Leydig immortalizzate murine, TM3, entrambe delle linee cellulari testicolari.

Inoltre, come detto, visto che in letteratura vi sono pochi articoli inerenti al metabolismo del VCH e sugli effetti dei suoi metaboliti, abbiamo trattato le linee cellulari A549, HepG2, TM3 e TM4 con due metaboliti del VCH, il VCD e l'1,2-VCHME per calcolare l'IC₅₀ e valutare gli effetti di questi metaboliti a livello cellulare.

4.3.2 Agenti chimici

Il VCH (purezza 99%), Vinicicloesano (VCA, purezza 99%), Stirene (STY, purezza >99%), VCD (purezza >96%), 1,2-VCHME (purezza 98%) sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich (Milano, Italia). I valori di densità e punto di ebollizione per il VCH sono rispettivamente 0.832 g/mL a 25°C e 127°C, per il VCA sono 0.805 g/mL a 25 °C e 128°C, per lo STY 0.906 g/mL a 25°C e 146 °C, per il VCD sono 1.094 g/mL a 25 °C e 232 °C, per il 1,2-VCHE 0.952 g/mL a 25 °C e 169 °C.

4.3.3 Colture cellulari e trattamenti

I terreni utilizzati per la crescita delle diverse linee cellulari erano rispettivamente: DMEM per le SK-N-MC, RPMI per le A549, le HepG2, le HL60 e le CHOK1, HEM'S F12 più DMEM (1:1) per le TM3 e le TM4. I terreni erano supplementati con il 10% di siero fetale bovino (FBS), glutammina (2 mM), streptomicina (100 µg/ml) e penicillina (100 U/ml). Le cellule sono state incubate a 37°C con il 5% di CO₂ in atmosfera umidificata. Queste condizioni sono state mantenute nel “sistema aperto”. Per limitare l’evaporazione abbiamo utilizzato anche un “sistema chiuso” e le cellule sono state coltivate e trattate in un terreno CO₂ indipendente. Per gli esperimenti, le A549 sono state seminate ad una concentrazione pari a 70.000 cellule/ml, le SK-N-MC, HepG2, CHOK1, TM3 e TM4 ad una concentrazione di 100.000 cellule/ml, le HL60 ad una concentrazione di 200.000 cellule/ml. Tutte le linee cellulari sono state trattate quando hanno raggiunto la fase esponenziale di crescita, circa dopo 24 ore dalla semina, con le sostanze in esame, per tempi diversi a seconda dell’*endpoint* valutato. Le soluzioni stock di VCH, VCA, STY, 1,2-VCHME e VCD sono state diluite in modo appropriato, immediatamente prima dell’esperimento nel terreno di coltura a concentrazioni crescenti.

4.3.4 Valutazione della citotossicità

Per valutare la vitalità cellulare è stato utilizzato il test dell'MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), un saggio colorimetrico standard che misura la capacità degli enzimi mitocondriali ed in particolare della succinato deidrogenasi, di ridurre l'MTT in formazano dando alla sostanza un colore blu/violaceo. L'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, è attivo infatti soltanto nelle cellule vive e la sua funzione consiste nel tagliare l'anello di tetrazolio dell'MTT (sostanza di colore giallo) con la formazione, di conseguenza, di formazano (un sale blu) (Mossman, 1983). Il metodo è descritto da Vettori *et al.* (2006). Per determinare le curve concentrazione-risposta ed i valori di IC₅₀, le cellule sono state esposte a: 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mM di ciascun xenobiotico per 24 ore.

4.3.5 Valutazione del ciclo cellulare

La distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare è stata valutata determinando il contenuto di DNA dei nuclei marcati con propidio ioduro (PI), utilizzando la citofluorimetria. Brevemente, quando le cellule erano in fase esponenziale sono state trattate per 24 h con le sostanze oggetto dello studio. Successivamente sono state raccolte, lavate con PBS, privo di Ca²⁺ e Mg²⁺ ma supplementati con EDTA 0.5 mM, e fissate con 3 mL di etanolo al 96%. Dopo essere state fissate, circa $1-1.5 \times 10^6$ cellule sono state lavate una volta in PBS e colorate in 2 mL di propidio ioduro-PI (20 µg/mL in PBS) e 25 µL di RNasi-A (1 mg/mL in H₂O) a 4°C overnight. L'analisi in citofluorimetria del ciclo cellulare è stata effettuata mediante FACSCalibur (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) (Bisceglie *et al.*, 2014). La distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare è stata calcolata in termini di percentuali con FlowJo (Tree Star, Inc.).

4.3.6 Estrazione RNA totale

L'RNA totale è stato estratto da circa 10^5 cellule utilizzando il reagente TRIzol (Invitrogen, CA, USA), soluzione monofasica di fenolo e guanidina isotiocianato, il cui protocollo si basa sulla metodica messa a punto da Chomczynski e Sacchi (Chomczynski e Sacchi 1987, Anal.Biochem. 162,156).

In breve 10^5 cellule sono state lisate in 1 ml di Trizol ed incubate 5 minuti a temperatura ambiente. A ciascun campione sono stati quindi aggiunti 0,2 ml di cloroformio (Carlo Erba Reagenti). Ciascun campione è stato successivamente agitato vigorosamente per 15 secondi ed incubato a temperatura ambiente per 2-3 minuti. Le provette sono state centrifugate a 12000 g per 15 minuti a 4°C. Al termine della centrifugata, la fase acquosa sovrastante è stata prelevata, messa in una nuova provetta, a cui sono stati aggiunti 0,5 ml di isopropanolo (Carlo Erba Reagenti). I campioni sono stati incubati 10 minuti a temperatura ambiente e centrifugati a 12000 g per 10 minuti a 4°C. Il sovrinatante è stato quindi rimosso ed il pellet di RNA è stato lavato con etanolo al 75%, agitato e centrifugato a 7500 g x 5 minuti a 4 °C. Il sovrinatante è stato quindi eliminato, il pellet di RNA lasciato ad asciugare per 10 minuti e risospeso in 50 µl di RNA Storage Solution (Ambion TX, USA), incubato 10 minuti a 60°C e successivamente congelato a -80°C.

4.3.7 Digestione con DNase I

Una volta estratto l'RNA totale è stato digerito con DNase I. Questo ulteriore passaggio è utilizzato allo scopo di eliminare l'eventuale contaminazione di DNA dal campione, che potrebbe portare successivamente ad amplificazioni aspecifiche. Tale digestione è stata condotta con l'utilizzo del kit DNA-free (Ambion TX, USA).

In breve a 30 µl di RNA per ciascun campione sono stati aggiunti 3 µl di 10x DNase I Buffer, 1 µl di rDNase I (2 U/µl) e quindi incubati a 37°C per 30 minuti. Al termine dell'incubazione sono stati aggiunti 0,1 volumi di DNase Inactivation Reagent a ciascun campione per inattivare

l'enzima precedentemente aggiunto e per rimuovere i cationi divalenti, come magnesio e calcio, che potrebbero portare ad una degradazione dell'RNA. I campioni sono stati quindi incubati 2 minuti a temperatura ambiente e successivamente centrifugati a 10000 x g per 1.5 min. Il sovranatante è stato prelevato, posto in una nuova provetta e congelato immediatamente a -80°C.

4.3.8 Visualizzazione RNA in elettroforesi

L'integrità dell'RNA estratto è stata valutata in elettroforesi orizzontale in gel d'agarosio NuSieve (Lonza, ME, USA) all'1% in tampone denaturante. Le bande visualizzate corrispondevano agli RNA 18S e 28S. Come atteso l'intensità della banda 28S risultava essere circa il doppio rispetto alla banda del 18S. Questo rapporto di 2:1 è un buon indicatore per l'integrità dell'RNA.

4.3.9 Retrotrascrizione dell'RNA totale in cDNA

La reazione di retrotrascrizione è basata sull'utilizzo dell'enzima Super Script III, il quale rappresenta una versione ingegnerizzata della retrotrascrittasi M-MLV, con una maggiore stabilità termica e una ridotta attività RNase H. A 500 ng di RNA totale sono stati aggiunti 4 µl di 5xVILO *Reaction Mix*, 2 µl di *Superscript Enzyme Mix* in un volume finale di 20 µl (Invitrogen, CA, USA). I campioni sono stati quindi incubati a 25°C per 10 minuti, a 42°C per 60 minuti e a 85°C per 5 minuti. Al termine della reazione di retrotrascrizione i campioni sono diluiti 1:2 in H₂O RNase free (Ambion) e quindi congelati a -80°C.

4.3.10 Quantificazione dei trascritti in Real Time PCR

Le reazioni di PCR quantitativa in tempo reale, in duplicato per ciascun campione, sono state eseguite su termociclatore iCycler iQ Real-Time Detection System (BioRad, CA, USA) con sonde specifiche marcate all'estremità 5' con fluoresceina per i geni *CDK4*, *CDK6*, *CCND1*, *CDK2*, *CCNE1*, *p21*.

La miscela di reazione per l'amplificazione con sonde specifiche era costituita da 2µl di cDNA precedentemente diluito, 400 nM di *primers forward* e *reverse* specifici per ciascun gene, 0.1 µM di probe, TaqMan 2x Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Life Technologies, CA, USA) ed H₂O per un volume finale di 25µl.

Il protocollo di amplificazione con le sonde marcate con fluoresceina prevedeva un ciclo di denaturazione di 10 minuti a 95°C seguito da 40 cicli, ciascuno dei quali costituito da 2 step di 20 secondi a 94°C e di 1 minuti a 60°C.

Per ogni reazione di amplificazione oltre ai campioni in doppio veniva allestita una curva standard con un cDNA a concentrazione nota ed un campione negativo, dove al posto del cDNA veniva aggiunta H₂O.

La stima dell'espressione è stata ottenuta dopo normalizzazione rispetto ai geni di controllo *succinate dehydrogenase complex, subunit A (SDHA)*, *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT)*, *ribosomal protein L13 (RPL13)* con algoritmo *geNorm* per Microsoft Excel™ (Vandesompele *et al.*, Genome Biology, 2002).

Le Universal Probe Library (Roche Applied Sciences, CH) che abbiamo usato negli esperimenti in Real-Time PCR per la quantificazione dei messaggeri, sono delle corte sonde ad idrolisi di 8-9 nucleotidi, marcate all'estremità 5' con fluoresceina (FAM) e all'estremità 3' con un "dark quencher". Per ottenere caratteristiche d'ibridazione superiori ed elevata biostabilità rispetto alle convenzionali sonde, nella loro sequenza hanno incorporati degli LNA (Locked Nucleic Acid).

Gli LNA sono un nuovo tipo analogo di acidi nucleici contenenti un ponte metilenico che collega l'ossigeno in posizione 2' con il carbonio in posizione 4'. Questo legame fosfodiesterico intramolecolare a livello dello zucchero desossiribosio irrigidisce la struttura conferendo in tal modo una maggiore affinità tra la sonda ed il filamento di DNA target (**Figura 14**).

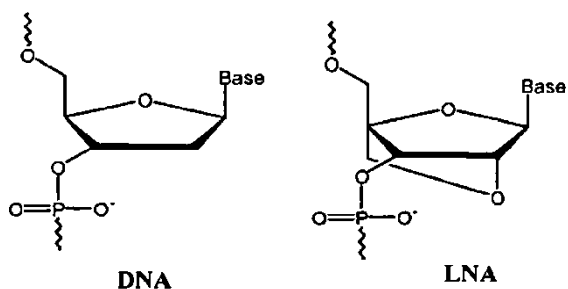


Figura 14. Struttura degli *Locked Nucleic Acid* (LNA).

4.3.11 Analisi SPME-GC-MS

Gli analiti sono stati analizzati utilizzando la tecnica di estrazione *solvent-free Solid Phase Micro Extraction* (SPME) e quindi analizzati in gas cromatografia-spettrometria di massa (GC-MS).

4.3.11.1 Procedura SPME

Per l'estrazione degli analiti è stata applicata la tecnica SPME così come descritto da Poli *et al.* (2004). In breve, è stata utilizzata una fibra utilizzata Carboxen-PDMS 75 μm (Supelco, Bellefonte, PA) esposta nello spazio di testa dei campioni di medium per 20 minuti a 60°C. Dopo l'estrazione la fibra è stata immediatamente desorbita nell'iniettore del gas cromatografo a 280°C per 10 minuti per evitare effetti memoria. L'estrazione è stata effettuata utilizzando un autocampionatore Combi/Pal (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland).

4.3.11.2 Spettrometria di massa accoppiata a gas cromatografia (GC/MS)

Le analisi sono state effettuate utilizzando un gas cromatografo HP6890 accoppiato ad uno spettrometro di massa 5973 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). La separazione è stata effettuata con una colonna CP-SIL-5CB-MS utilizzando la seguente programmata di temperatura: 40°C per 4 minuti, un incremento di temperatura di 5°C/minuto fino a 80°C, e di seguito uno di 20°C/minuto fino a 150°C mantenuto poi per un minuto, per una corsa cromatografica totale di

24 minuti. Come fase mobile è stato utilizzato l'idrogeno e come standard interno lo Stirene deuterato.

L'acquisizione è stata effettuata lavorando in SIM (*selected ion monitoring*) cioè acquisendo gli ioni caratteristici m/z degli analiti di interesse come indicato di seguito. Tra parentesi è riportato il valore di dwell time:

- VCH: 79(50), 80(100), 93(150);
- VCA: 81(50), 82(100), 110(100);
- STY: 102(100), 104(50);
- 1,2-VCHME: 79 (60), 80 (50), 81 (70);
- Diolo dell'1,2-VCHME: 96 (150), 78 (30);
- VCD: 79 (40), 81 (80);
- Tetrololo del VCD: 93 (50), 128 (150);
- Sty deuterato (SI): 110(70), 112(150).

4.3.11.3 Ottimizzazione e validazione dei parametri SPME per VCH e VCD

In una fase preliminare sono stati ottimizzati i parametri di estrazione SPME studiando sia il tempo che la temperatura di estrazione ed infine l'effetto salino-negativo (*salting-out effect*). È noto infatti che l'aggiunta del sale ad un sistema acquoso come il medium incrementa la volatilità degli analiti aumentandone così la percentuale estratta dallo spazio di testa. (Dati non mostrati).

Il metodo è stato quindi validato in SIM studiando l'intervallo di linearità ($\text{Area}/\text{Area SI} = f(M)$), la retta di calibrazione, la sensibilità (in termini di coefficiente angolare) e l'imprecisione del metodo (come RSD%) ed infine il limite di rivelazione (LOD come segnale/rumore=3) e di quantificazione (LOQ calcolato come uguale a circa 3 volte il LOD) (**Tabella 15**).

	VCA	VCH	Sty	1,2-VCHME	VCD
Intervallo di linearità	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁶ 10 ⁻⁶ -10 ⁻³	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁶ 10 ⁻⁶ -10 ⁻³	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁶ 10 ⁻⁶ -10 ⁻³	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁶	10 ⁻⁸ -10 ⁻⁶
Coefficiente angolare	3X10 ⁶ 296958	4X10 ⁶ 383968	1X10 ⁷ M 4X10 ⁶ M	58645	63882
R²	0.998 0.97	0.995 0.998	0.998 0.998	0.972	0.984
LODs	3X10 ⁻⁹	2X10 ⁻⁹	1X10 ⁻¹⁰	3X10 ⁻⁹	3X10 ⁻⁹
LOQ	1X10 ⁻⁸	6X10 ⁻⁹	0.5X10 ⁻⁹	1X10 ⁻⁸	1X10 ⁻⁸
Precisione (RDS %)					
<i>Intra-day</i>	<8%	<7.2%	<6.3%	<8.30%	<9.6%
<i>Inter-day</i>	<12%	<9%	<8.2%	<10.2%	<12.5%

Tabella 15. Parametri di validazione del metodo per VCH, VCA, Sty, VCD e 1,2-VCHME.

Nel caso dei prodotti di idrolisi dell'1,2-VCHME e del VCD, cioè del diolo dell'1,2-VCHME e del tetrololo del VCD, non avendo a disposizione gli standard è stata effettuata un'analisi semi-quantitativa utilizzando le rette di calibrazione dei corrispettivi epossidi.

4.3.12 Analisi LC-MS/MS

L'identificazione e la determinazione semiquantitativa dei metaboliti di fase II del VCH, in particolare i metaboliti mercapturati, glicuro- e solfo-coniugati, è stata eseguita mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa *tandem* (LC-MS/MS), utilizzando standard commercialmente disponibili di composti con struttura analoga come il mercapturato del benzene (acido S-fenilmercapturico, S-PMA) e quello del toluene (acido S-benzilmercapturico, S-BMA) e i metaboliti glicuro e solfo coniugati del naftolo (rispettivamente α -naftilglucuronide, NG e β -naftilolfato, NS). Le analisi sono state effettuate utilizzando uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo modello API 4000 (AB-Sciex, Framingham, MA, USA), dotato di una interfaccia *Turboionspray* per la ionizzazione *electrospray* (ESI) assistita pneumaticamente. I composti d'interesse sono stati separati utilizzando una colonna Atlantis[®]dC₁₈ (100 x 3.0 mm i.d., 3 μ m, Waters) ed una fase mobile composta da acido formico acquoso (10 mM, pH=3,75 per aggiunta di idrossido d'ammonio) e metanolo in proporzioni

variabili (gradiente di eluizione). Prima dell'iniezione in colonna di un volume di 10 µl, i campioni di medium sono stati centrifugati su centricon (Amicon, 3KDa) per 20 minuti a 14 g, e acidificati con acido formico (0,2 M). L'analisi sui pellet cellulari ha richiesto l'aggiunta di 300 µl di acqua e quattro cicli di congelamento e scongelamento prima della centrifugazione.

Per l'identificazione dei metaboliti incogniti, l'acquisizione in spettrometria di massa *tandem* è stata ottenuta in ionizzazione negativa, ed operando in modalità *Product ion*, dove il primo quadrupolo seleziona uno ione di rapporto massa/carica (m/z) fissato, corrispondente alla molecola deprotonata ("ione padre"), e dopo la frammentazione indotta nella cella di collisione (o secondo quadrupolo), il terzo quadrupolo effettua una scansione su un determinato range di m/z . In questo modo è possibile dall'analisi dei frammenti avere informazioni sull'identità e la struttura di una molecola.

Per l'analisi semi-quantitativa, l'acquisizione in MS/MS è stata ottenuta in ionizzazione negativa, ed in modalità SRM (*Selected Reaction Monitoring*), ovvero selezionando con il primo quadrupolo lo ione corrispondente alla molecola deprotonata ("ione padre") e con il terzo quadrupolo il caratteristico "ione figlio", risultante dalla frammentazione indotta nella cella di collisione (o secondo quadrupolo) in modo da ottenere la massima sensibilità e selettività permessa dalla tecnica. Per i metaboliti del vinilcicloesene, del benzene, del toluene e del naftolo (utilizzati per l'analisi semiquantitativa) sono state monitorate le transizioni caratteristiche di ciascun composto, ovvero m/z 286→157 per i mercapturati del VCH; m/z 301→113, m/z 301→125 e m/z 301→175 per i glicuroconiugati del VCH; m/z 205→125 per i solfati del VCH; m/z 238→109 per *S*-PMA; m/z 252→123 per *S*-BMA; m/z 319→113 per NG e m/z 223→143 per NS.

L'analisi quantitativa è stata effettuata mediante il metodo della calibrazione in matrice, ovvero aggiungendo ad un pool di campioni di medium o di estratti di pellet cellulari, soluzioni a concentrazione nota e crescente degli standard commercialmente disponibili negli opportuni intervalli di concentrazione.

4.3.13 Analisi statistica

I dati inerenti le curve concentrazione-risposta di VCH, VCA, Sty, 1,2-VCHME e VCD sono espressi come la media \pm ES di almeno tre esperimenti indipendenti. Tali curve sono state estrapolate applicando ai dati sperimentali la funzione di Hill (Hill, 1910):

$$Viability (V) = V_0 \left(1 - \frac{x^n}{(IC_{50})^n + x^n} \right)$$

Dove V_0 rappresenta la vitalità massima (100%), n l'indice di cooperatività relativo alla pendenza della curva e x la concentrazione del composto.

La benchmark dose (BMD_{10}), la concentrazione alla quale si osservava un calo della vitalità pari al 10%, ed il suo estremo inferiore al 95% dell'intervallo di confidenza ($BMDL_{10}$) sono stati calcolati con *Benchmark Dose Software* (BMDS) 1.4.1 (US EPA, Washington, DC).

Le differenze nell'espressione dell'mRNA delle cicline, chinasi cicline-dipendenti e p21 sono state valutate per mezzo dell'analisi della varianza ad una via (ANOVA) seguita dal test di Bonferroni a comparazione multiple come *post-hoc*.

E' stato usato SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL) e un valore di $p=0.05$ è stato considerato come significativo.

4.4 RISULTATI

4.4.1. Studio dell'effetto della struttura chimica sulla tossicità del VCH

4.4.1.1 Curve di vitalità del VCH, del VCA, dello Sty

L'obiettivo era di confrontare in base all'analogia strutturale la tossicità del VCH rispetto al VCA e allo Sty. In seguito al trattamento delle diverse linee cellulari con i tre xenobiotici, i primi risultati ottenuti sono inerenti alle curve concentrazione-risposta. In figura 15 sono riportati i risultati inerenti alla linea polmonare (dati non mostrati per le altre linee cellulari).

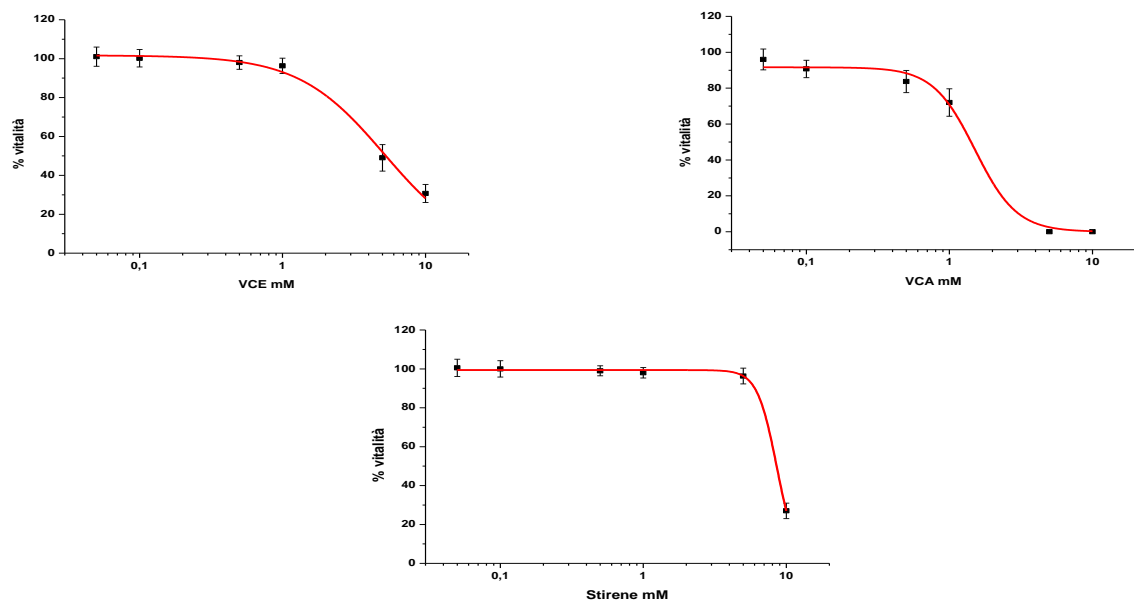


Figura 15. Curve concentrazione-risposta di VCH, VCA e Sty (linea cellulare A549).

Le curve concentrazione-risposta della linea polmonare per i tre xenobiotici, evidenziano un valore di IC_{50} per il VCH di circa 5.2 mM, un IC_{50} di 1.5 mM per il VCA e un IC_{50} di 8.6 mM per lo Sty.

4.4.1.2 Determinazione dei valori di Benchmark Dose e Lower Benchmark Dose per il VCH, VCA e Sty

In seguito, dopo aver calcolato l'IC₅₀, ovvero la concentrazione che determina una riduzione del 50% della vitalità cellulare, per fare un confronto tra lo studio *in vitro* con il *vivo*, abbiamo calcolato la *Benchmark Dose* (BMD), ovvero un valore che di fatto corrisponde all'IC₁₀. Per avere una maggiore precisione è stata calcolata anche la *Lower Benchmark Dose* (BMDL), ovvero l'estremo inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% della BMD (Goldoni *et al.*, 2003). Nella tabella 16 vengono indicati i valori soglia estrapolati.

	IC ₅₀ (mM)	IC ₁₀ (mM)	BMDL ₁₀ (mM)
A549 (POLMONARI)			
Sty	8.6 (ES: 0.1)	5.8	5.1
VCH	5.2 (ES: 0.4)	3.6	0.9
VCA	1.5 (ES: 0.2)	1.0	0.5
CHO-K1 (OVARICHE)			
Sty	8.4 (ES: 0.3)	5.2	5.0
VCH	>10 (eff max 27%)	5.7	5.2
VCA	2.7 (ES: 0.1)	1.5	1.2
SK-N-MC (NEURONALI)			
Sty	>10	>10	>10
VCH	>10	>10	>10
VCA	1.5 (ES: 0.6)	1.0	1.0
HepG2 (EPATICHE)			
Sty	>10 (satura a 85%)	0.9	0.5
VCH	>10	>10	>10
VCA	7.4 (ES: 2.0) – max 57%	0.3	0.2
HL60 (LEUCEMICHE)			
Sty	3.7 (ES: 0.1)	1.6	1.3
VCH	4.8 (ES: 0.6)	0.5	0.4
VCA	0.5 (ES: NC)	<0.05	<0.05

Tabella 16. Valori di IC₅₀, IC₁₀, BMDL₁₀ di VCH, VCA E Sty nelle linee cellulari studiate.

In generale, il VCA si è rivelato essere la sostanza più tossica in tutte le linee cellulari in studio.

Si osservano effetti >10% (BMDL₁₀) per dosi comprese tra <0.05 mM e 1.2 mM.

Per quanto riguarda il VCH, si osservano effetti precoci sulla linea polmonare (0.9 mM) e su linea leucemica (0.4 mM). Più limitati, sono invece gli effetti sulla linea ovarica (5.2 mM), non vi sono effetti su linee neuronali ed epatiche.

Lo Sty evidenzia degli effetti precoci a livello epatico, anche se c'è saturazione all'85% e sulla linea leucemica (1.3 mM). Si osservano effetti minori a livello polmonare (5.1 mM), ovarico (5.0 mM) e non vi sono effetti a livello della linea neuronale.

Inoltre, in studi successivi abbiamo utilizzato anche altre due linee cellulari: le TM3 (cellule immortalizzate del Sertoli, murine) e le TM4 (cellule immortalizzate di Leydig, murine) entrambe delle linee cellulari testicolari. Anche in queste linee sono stati calcolati i valori di IC₅₀, IC₁₀ e BMDL₁₀ in seguito al trattamento solo con VCH. Abbiamo ottenuto un valore di IC₅₀ di 3.64 mM (es: 0.69), un IC₁₀ di 1.56 mM e un BMDL₁₀ di 1.02 mM per le TM3, e un valore di IC₅₀ di 3.1 mM (es: 0.52), un IC₁₀ di 0.77 mM e un BMDL₁₀ di 0.62 mM per le TM4.

4.4.1.3 Determinazione degli effetti a livello cellulare

I primi risultati ottenuti trattando le linee cellulari ad una concentrazione di 0.3 mM, concentrazione scelta sulla base di studi precedentemente pubblicati dal nostro team di lavoro (Poli *et al.*, 2004), non hanno evidenziato effetti a livello cellulare (dati non riportati).

Successivamente, esponendo la linea polmonare per 24 ore con VCH, VCA e Sty ad una concentrazione corrispondente alla metà dell'IC₅₀ (0.8 mM di VCA, 2.6 mM di VCH e 4.4 mM di Sty) quello che abbiamo osservato era una riduzione del numero delle cellule. Siamo andati, quindi, ad indagare gli effetti a livello del ciclo cellulare.

Da un'analisi preliminare emerge che l'esposizione a VCA (**Figura 16 C**) causa un aumento del 12% delle cellule in fase G₀/G₁ e una diminuzione del 39% delle cellule in fase G₂/M, se paragonata al controllo (**Figura 16 A**). Il trattamento con VCH (**Figura 16 D**) causa un aumento del 15% delle cellule in fase G₀/G₁ e un calo del 50% di quelle in fase G₂/M, quando paragonate al controllo. Infine, l'esposizione a stirene (**Figura 16 B**) ha evidenziato un aumento del 10% delle cellule in fase G₀/G₁ e una diminuzione del 22% in fase G₂/M, rispetto al controllo.

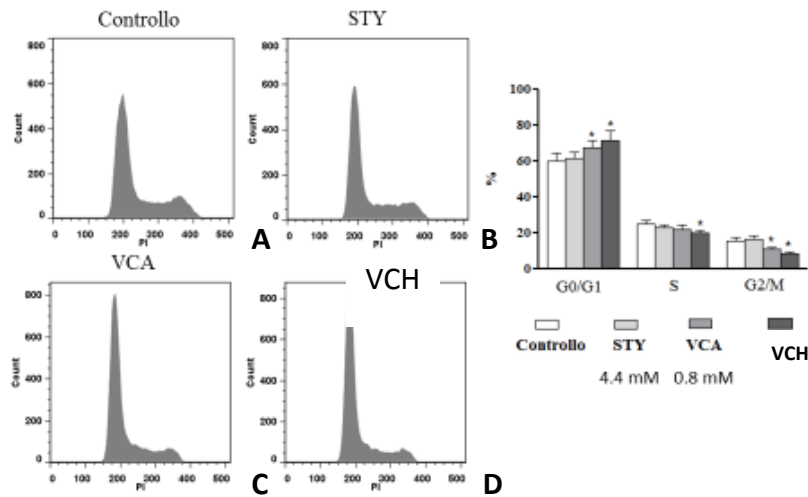


Figura 16. Distribuzione delle A549 nelle fasi del ciclo cellulare. (A) controllo, (B) STY (stirene), (C) VCA (vinilcicloesene), (D) VCH (vinilcicloesene) ($p < 0.05$).

Valutando la distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare anche per le HepG2 (**Figura 17**), le TM3 (**Figura 18**) e le TM4 (**Figura 19**) si evince come le linee TM3 e TM4 siano bloccate nelle prime fasi del ciclo cellulare, con un andamento simile alla linea polmonare vista sopra. Nella linea epatica si osserva un blocco cellulare in una fase tardiva, se paragonato con le altre linee cellulari, con un aumento importante delle cellule in fase G₂/M.

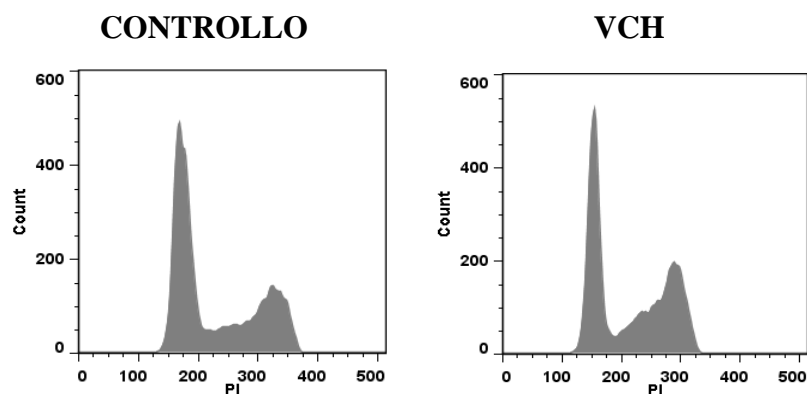


Figura 17. Distribuzione delle HepG2 nelle fasi del ciclo cellulare.

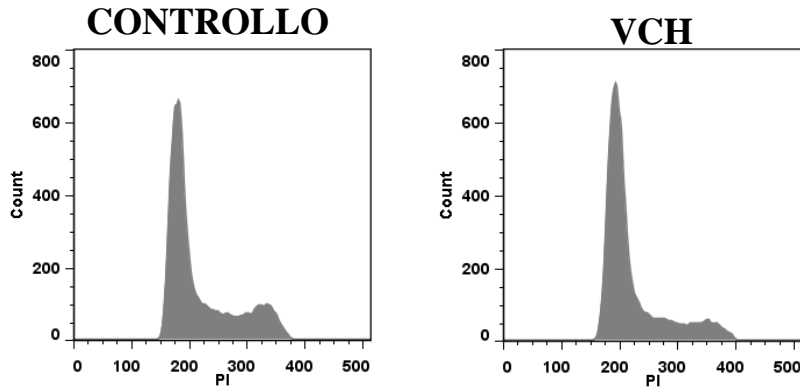


Figura 18. Distribuzione delle TM3 nelle fasi del ciclo cellulare.

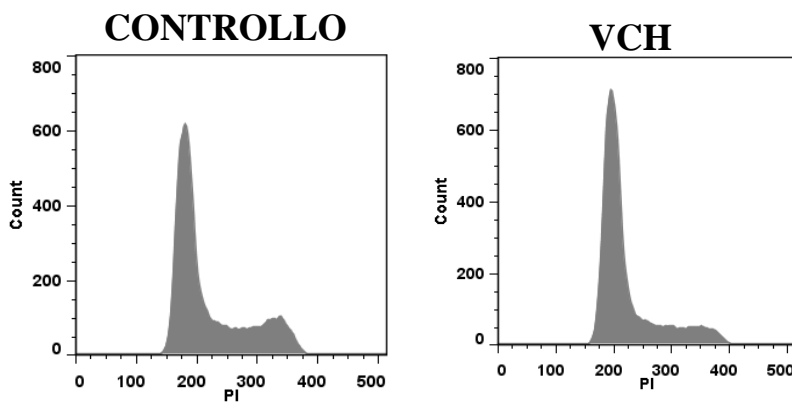


Figura 19. Distribuzione delle TM4 nelle fasi del ciclo cellulare.

4.4.1.4 Determinazione dell'espressione genica a livello del ciclo cellulare

Abbiamo valutato l'espressione genica delle diverse proteine (alle 2, 4 e 24 ore) coinvolte nelle prime fasi del ciclo cellulare per indagare sui possibili motivi da ricollegare al blocco cellulare osservato dopo il trattamento con il VCH. Le proteine indagate sono le chinasi ciclina dipendenti CDK4 e CDK 6 (CDK, *cyclin-dependent kinasi*), che si associano con le cicline D ed E, CCND1 e CCNE1, la CDK2, e la proteina p-21, una proteina che in seguito ad attivazione porta l'inibizione dell'espressione delle cicline e delle chinasi ciclina dipendenti portano al blocco del ciclo cellulare.

I risultati ottenuti sono stati normalizzati ai risultati del controllo (**Figura 20**) in modo tale da osservare una iper- o una ipo-espressione rispetto ad esso. I risultati evidenziano una ipo-

espressione delle proteine coinvolte nell'avanzamento delle prime fasi del ciclo cellulare. I risultati sono statisticamente significativi per la CDK4 ($p < 0.001$ alle 24 ore), la CDK6 ($p < 0.0001$ alle 2 e 4 ore, $p < 0.001$ alle 24 ore), la CDK2 ($p < 0.005$ alle 24 ore) e la CCNE1 ($p < 0.001$ alle 2 ore, $p < 0.005$ alle 4 ore, $p < 0.0001$ alle 24 ore). La CCND1 non è risultata statisticamente significativa. Al contrario la p-21 è risultata iper-espressa, con un aumento statisticamente significativo ($p < 0.005$ alle 2 ore, $p < 0.0001$ alle 4 ore, $p < 0.001$ alle 24 ore) (**Figura 20**).

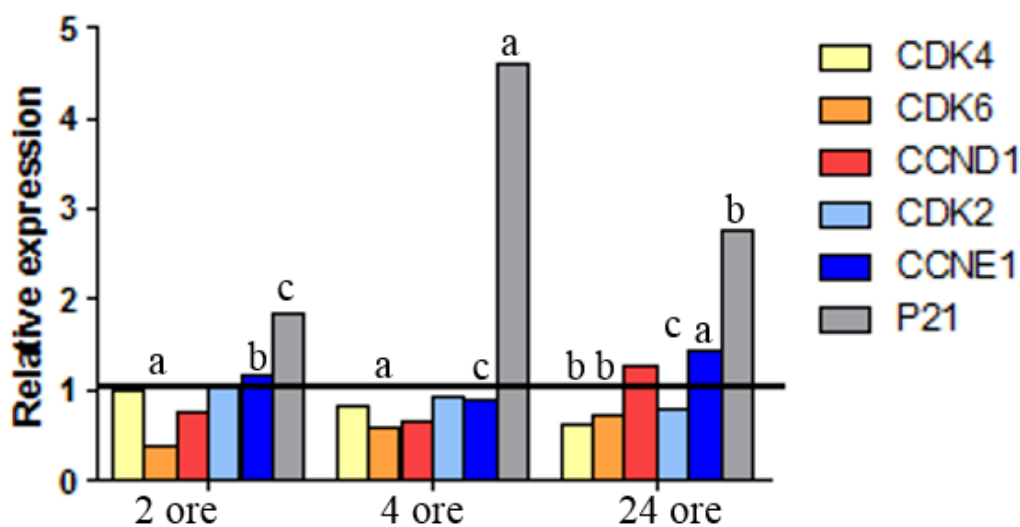


Figura 20. Espressione genica delle diverse proteine coinvolte nelle prime fasi del ciclo cellulare (a= $p < 0.0001$; b= $p < 0.001$; c= $p < 0.05$).

4.4.2. Determinazione della biodisponibilità del VCH *in vitro*

4.4.2.1 Determinazione della concentrazione reale rispetto alla concentrazione nominale

Successivamente, in base ai risultati ottenuti a livello cellulare, siamo andati a valutare se vi fosse corrispondenza fra la concentrazione reale e la concentrazione nominale. Lo studio è stato effettuato sulla linea A549 in un sistema aperto, in cui si dimostra come la concentrazione reale sia molto più bassa rispetto alla concentrazione nominale, con una riduzione importante nel tempo. Questo si osserva a livello del medium, di conseguenza la concentrazione di VCH

biodisponibile per le cellule risulta ulteriormente inferiore rispetto alla concentrazione nominale (Figura 21).

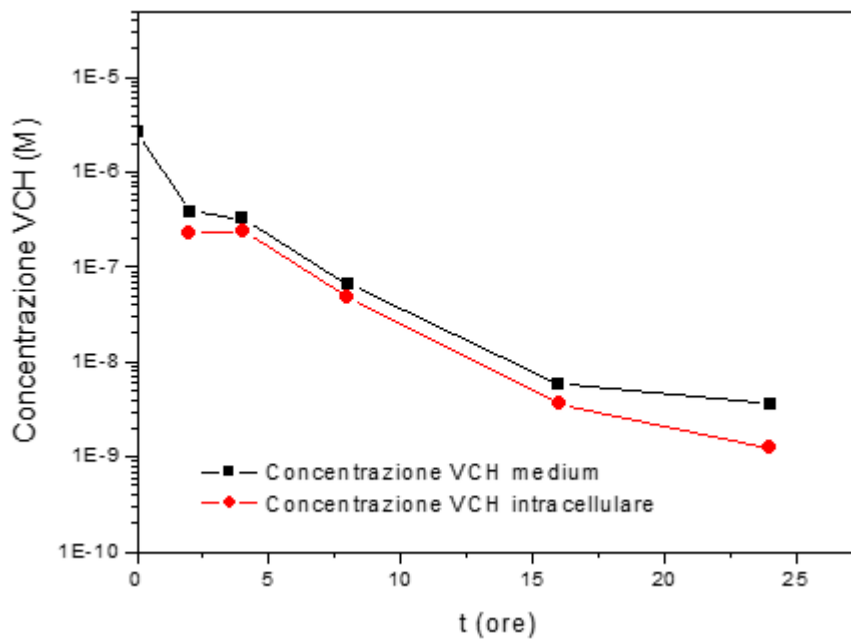


Figura 21. Concentrazione reale rispetto alla concentrazione nominale nel sistema aperto. Linea polmonare trattata con una concentrazione di VCH di 0.3 mM.

Questo risultato viene confermato anche dallo studio effettuato utilizzando un sistema chiuso, in cui la linea polmonare è stata esposta ad una concentrazione di VCH pari alla metà della concentrazione di IC_{50} . Come possiamo osservare in figura (Figura 22) vi è una prima fase rapida di diminuzione della concentrazione del VCH fino al raggiungimento di un equilibrio, equilibrio che nel sistema aperto non viene raggiunto, evidenziando anche in questo caso una differenza della concentrazione reale rispetto alla concentrazione sperimentale. Questi effetti sono dovuti molto probabilmente all'evaporazione e all'assorbimento da parte delle cellule.

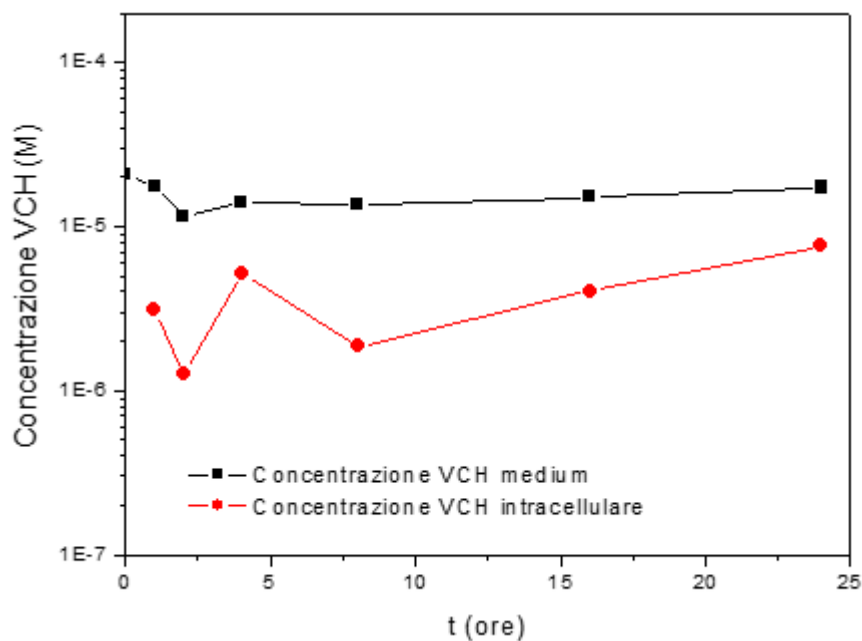


Figura 22. Concentrazione reale rispetto alla concentrazione nominale nel sistema chiuso. Linea polmonare trattata con una concentrazione di VCH di 2.6 mM.

4.4.2.2 Coefficiente di ripartizione medium/aria ($\lambda_{m/a}$) e cinetica di evaporazione

Abbiamo calcolato il coefficiente di ripartizione medium/aria, $\lambda_{m/a}$, per il VCH ai tempi brevi di 0, 10, 20, 30 e 40 minuti. I risultati mostrano una diminuzione della concentrazione di VCH nel medium nel tempo fino al raggiungimento di un equilibrio di ripartizione medium/aria che avviene dopo circa 20 minuti, con un equilibrio di ripartizione a favore dell'aria rispetto al medium, con un valore di $\lambda_{m/a}$ pari a 0.51 (**Figura 23**).

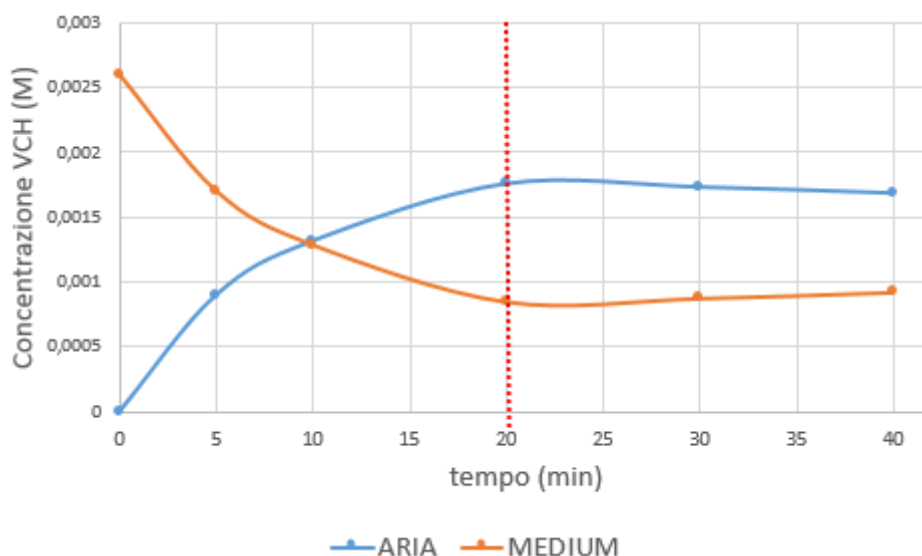


Figura 23. Coefficiente di ripartizione medium/aria ($\lambda_{m/a}$) del VCH.

Successivamente per avere ulteriori informazioni abbiamo calcolato anche il tempo di dimezzamento ovvero il tempo necessario per ridurre la quantità iniziale del 50%, calcolato sia nel sistema chiuso che nel sistema aperto (**Tabella 17**).

	Sistema Aperto	Sistema Chiuso
$t_{1/2}$ fase rapida	5 minuti	12.7 minuti
$t_{1/2}$ fase lenta	1.98 ore	5.82 ore

Tabella 17. Valori del $t_{1/2}$ nel sistema aperto e nel sistema chiuso.

Dai risultati del $t_{1/2}$ si evince che nella fase rapida nel sistema aperto abbiamo un $t_{1/2}$ di 5 minuti e di 12.7 minuti nel sistema chiuso. Nella fase lenta abbiamo un $t_{1/2}$ di 1.98 ore nel sistema aperto e di 5.82 ore nel sistema chiuso. Questi risultati evidenziano che la fase veloce di dimezzamento del VCH è nell'ordine dei minuti, fase in cui prevale l'effetto dell'evaporazione, seguita da una fase lenta nell'ordine delle ore, in cui prevale l'effetto della metabolizzazione.

4.4.2.3 Determinazione della percentuale della concentrazione intracellulare

Abbiamo misurato la percentuale della concentrazione di VCH assorbita nel tempo da parte della linea polmonare e della linea epatica, valutando eventuali differenze utilizzando sia il sistema aperto che il sistema chiuso. I risultati mostrano sia nella linea polmonare (**Figura 24 A**) che

nella linea epatica (**Figura 24 B**) che nel sistema chiuso vi sia un maggiore assorbimento di VCH da parte delle cellule rispetto al sistema aperto. Tale assorbimento risulta maggiore nella linea epatica, rispetto alla linea polmonare, in cui tale concentrazione nel tempo diminuisce, a differenza della linea polmonare che nel tempo continua l'assorbimento.

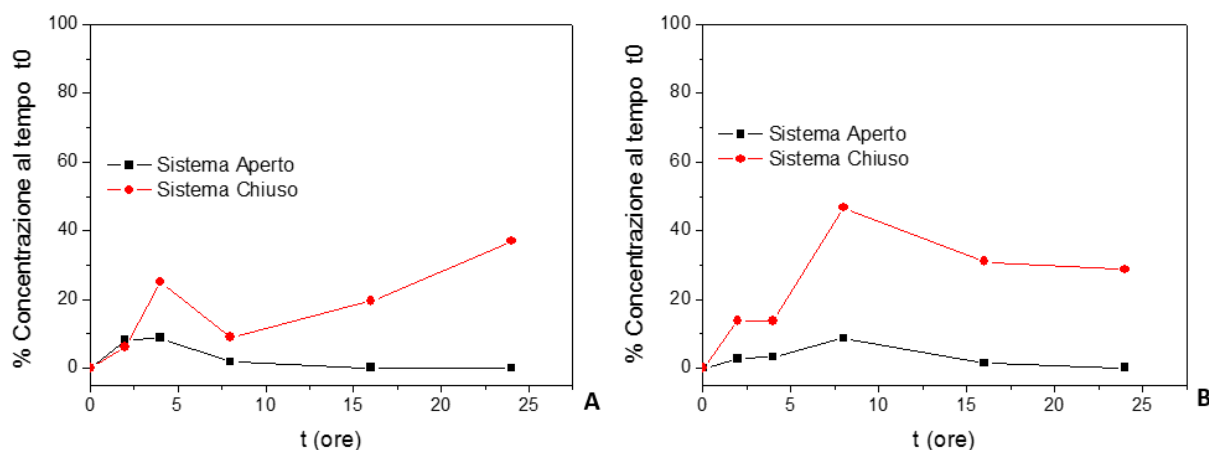


Figura 24. Percentuale della concentrazione di VCH intracellulare nel tempo, in un sistema chiuso e in un sistema aperto, a livello della linea polmonare (A) e della linea epatica (B).

Nel sistema aperto, invece, la percentuale della concentrazione di VCH diminuisce nel tempo.

4.4.3. Determinazione dei metaboliti di fase I e di fase II del VCH

In uno *step* successivo ci siamo occupati della messa a punto di metodi per la determinazione dei metaboliti di fase I e di fase II del VCH e la loro quantificazione *in vitro*.

4.4.3.1 Identificazione dei metaboliti di fase I in GC-MS

L'identificazione cromatografica e la relativa quantificazione degli epossidi del VCH è stata possibile grazie alla disposizione degli standard puri, a differenza dei prodotti di idrolisi corrispondenti per cui non sono commercialmente disponibili gli standard.

Perciò, in una fase preliminare, è stata necessaria la loro identificazione tramite estrazione SPME e analisi GC-MS della soluzione acquosa degli epossidi idrolizzati in ambiente basico per favorire la reazione di apertura dell'anello epossidico (catalisi basica). Dal confronto fra il

cromatogramma degli epossidi puri e quello dei prodotti di idrolisi e dalle ipotesi di frammentazione è stato possibile individuare il tempo di ritenzione del diolo dell'1,2-VCHME (Figura 25 A) e del tetrolo del VCD (Figura 25 B).

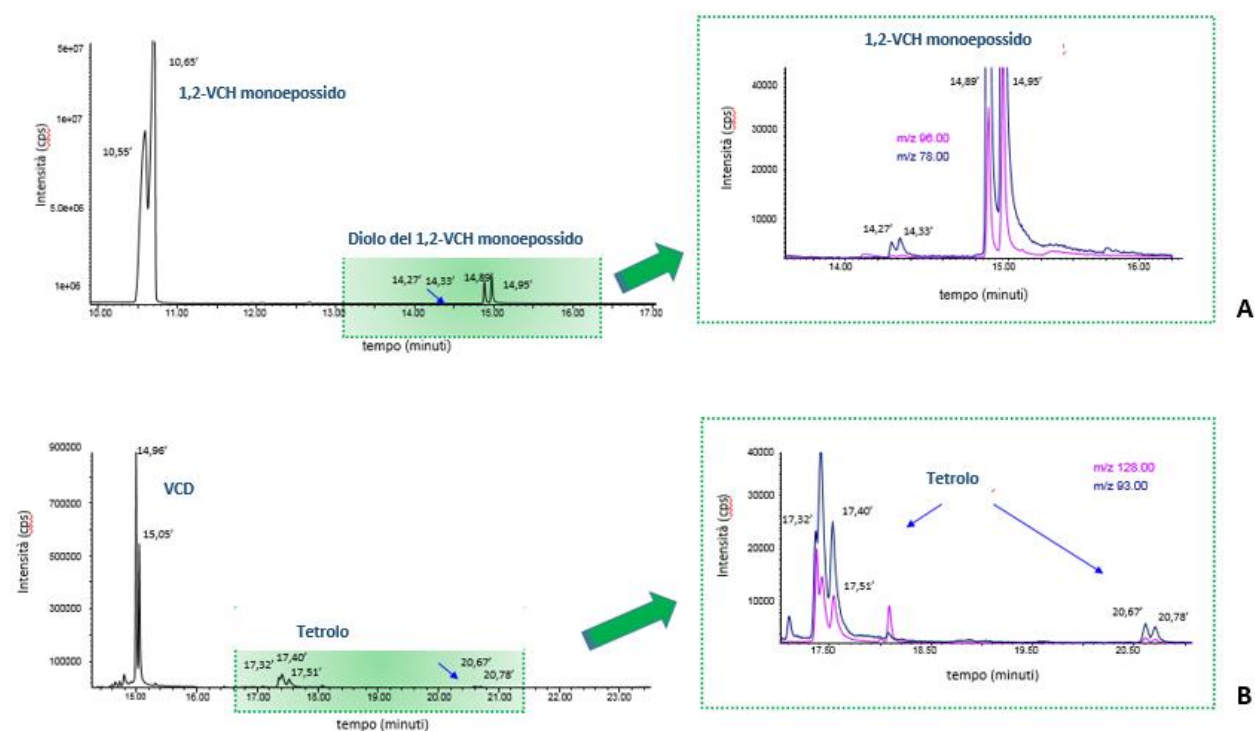


Figura 25. Identificazione del 1,2-VCHME e del rispettivo prodotto di idrolisi, il diolo del 1,2-VCHME (A), e del VCD e del rispettivo prodotto di idrolisi il tetrolo (B) in GC-MS. Per i prodotti di idrolisi sono indicati anche gli ioni caratteristici di frammentazione.

4.4.3.2 Studio di stabilità del 1,2-VCHME e del VCD del VCH nel medium cellulare

L'identificazione del diolo e del tetrolo degli epossidi del VCH ha messo in luce la loro non stabilità in una matrice acquosa. Perciò, per meglio comprendere la reale biodisponibilità degli epossidi e quindi la loro tossicità nonché l'efficacia dei sistemi metabolici di detossificazione dei metaboliti di fase II, è stato necessario studiare la loro stabilità nel medium di cultura cellulare.

Le soluzioni degli epossidi ad una concentrazione di 10^{-3} M sono state trattate a 20°C (per valutarne la stabilità a temperatura ambiente), a 37°C (temperatura alla quale vengono condotti gli esperimenti *in vitro*) e a 50°C (per verificare se un ulteriore incremento della temperatura

incidesse in modo significativo sull'idrolisi degli epossidi) per 24 ore, misurandone la concentrazione a 0, 8, 16 e 24 ore.

I risultati, riportati nella figura seguente, indicano una non stabilità degli epossidi nel terreno di cultura cellulare per effetto dell'idrolisi dell'anello epossidico, idrolisi tanto più spinta al crescere della temperatura (**Figura 26**). La non stabilità anche a temperatura ambiente è un fattore importante da tenere in considerazione nel caso della preparazione degli standard diluiti in medium di cultura cellulare. Tali standard vanno infatti preparati di volta in volta per assicurarsi che la concentrazione sia reale e non inferiore a quella di lavoro proprio per effetto di idrolisi delle molecole di partenza e conservati a basse temperature.

Si è visto inoltre come la reazione di idrolisi segua una cinetica del primo ordine il che ha permesso il calcolo dei relativi tempi di dimezzamento ($t_{1/2}$) a 37°C pari a 8,8 ore per l'1,2-VCHME e a 14,3 ore per il VCD. Il VCD mostra un $t_{1/2}$ più alto proprio per la necessità di idrolizzare due anelli epossidici.

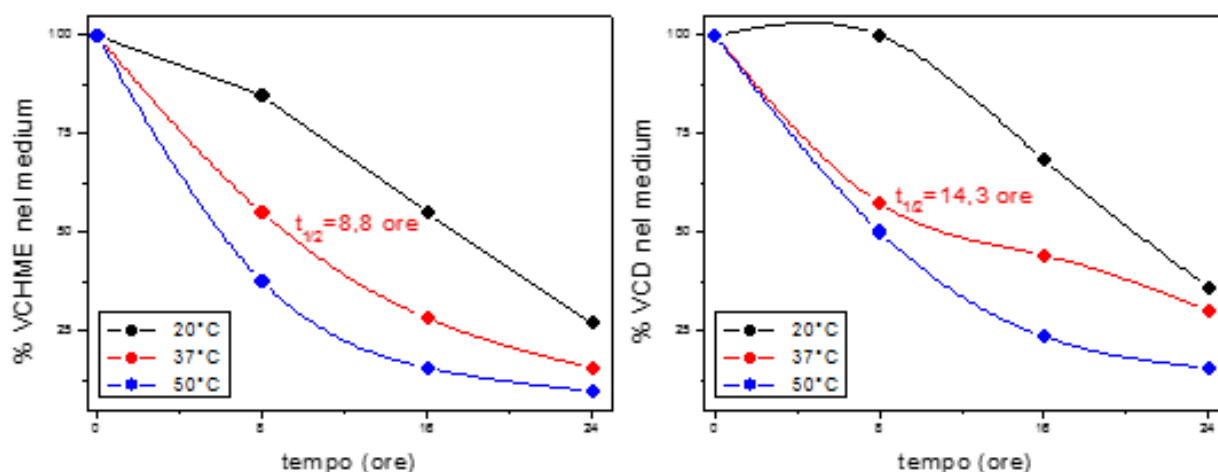


Figura 26. Degradazione tempo-dipendente dell'1,2-VCHME e del VCD nel medium di cultura cellulare a 20°C, 37°C e a 50°C per effetto dell'idrolisi dell'anello epossidico. La reazione di idrolisi segue una cinetica del 1° ordine $\ln(\text{conc } \%) = \ln(100 \%) - k t (\text{ore})$. In figura sono indicati i valori di $t_{1/2}$ calcolati per i 2 epossidi a 37°C.

L'andamento dell'esperimento a 37°C ha evidenziato come la biodisponibilità degli epossidi nel medium cellulare si riduca nel tempo in modo importante. Perciò, durante gli esperimenti *in vitro*

di esposizione a VCH è necessario tenere conto del fatto che la quota degli epossidi, principali responsabili dell'effetto tossico del VCH, si riducono nel tempo. Di conseguenza vi è un calo temporale anche nella produzione dei metaboliti di fase II come prodotti di detossificazione degli epossidi del VCH, osservando che il precursore dei metaboliti coniugati (l'eossido) in parte viene coniugato e in parte subisce idrolisi spontanea.

4.4.3.3 Identificazione dei metaboliti di fase II in LC-MS/MS

Date le scarse informazioni in letteratura per quanto riguarda i metaboliti di fase II del VCH, mediante analisi in LC-MS abbiamo identificato alcuni metaboliti coniugati. Non essendoci degli standard, in quanto commercialmente non sono disponibili, inizialmente sono state ipotizzate delle strutture di coniugati, mercapturati e glucuro-coniugati, sulla base dei principali enzimi di fase II noti, rappresentati dalla glucuronosiltransferasi (UDP) e dalla glutationtransferasi (GSTs), come mostrato in figura 27.

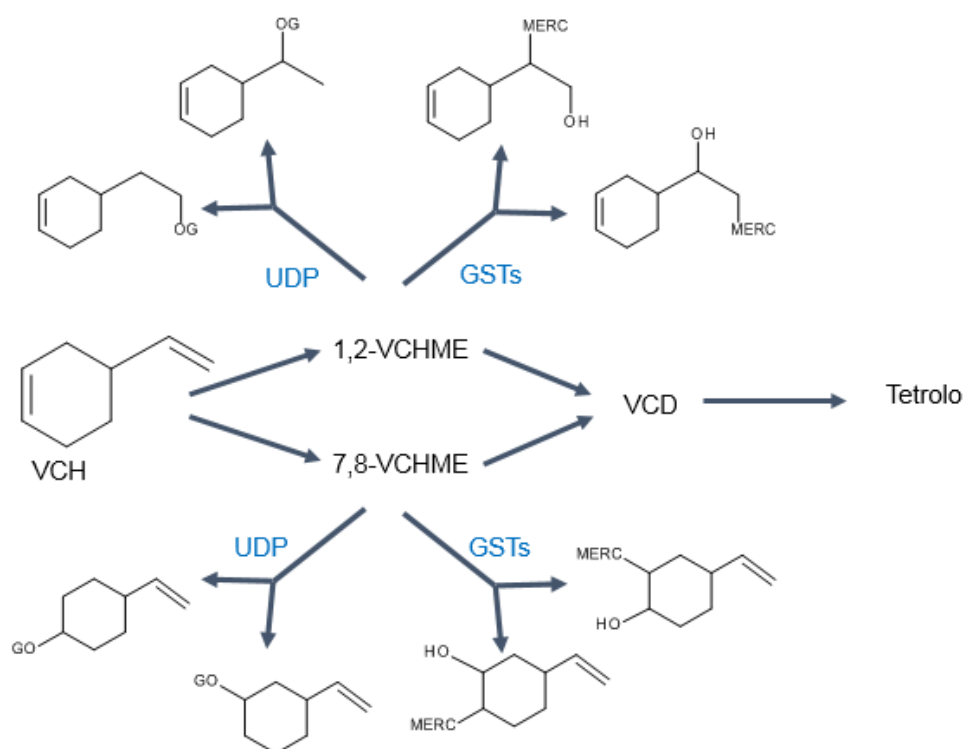


Figura 27. Ipotesi dei possibili metaboliti di fase II del VCH.

Successivamente, tramite esperimenti *in vitro*, studiando la linea epatica in seguito al trattamento di 24 ore con VCH, siamo riusciti a identificare i mercapturati e i glucuro-coniugati (**Figura 28**). Come possiamo osservare dal tracciato cromatografico, rispetto ai controlli, nella linea epatica, a livello del pellet cellulare, è possibile identificare alcuni metaboliti di fase II, nel nostro caso riusciamo ad identificare i mercapturati e i glucuro-coniugati.

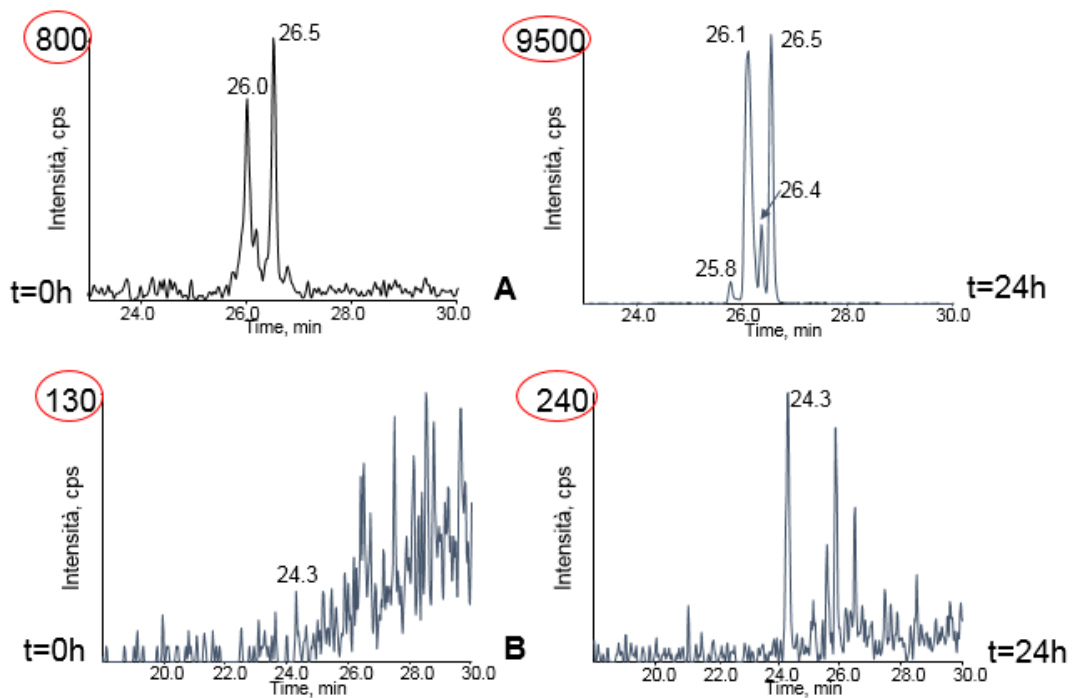


Figura 28. Identificazione dei metaboliti di fase II, i mercapturati (A) e i glucuro-coniugati (B) a livello della linea epatica mediante analisi in LC-MS.

4.4.3.4 Quantificazione di alcuni metaboliti di fase I e di fase II nelle linee cellulari trattate con VCH

Una volta effettuata l'identificazione dei metaboliti di fase I e dei metaboliti di fase II, siamo andati a valutare la loro concentrazione nel tempo a livello del medium cellulare a livello della linea epatica trattata con una concentrazione di VCH pari a 5 mM (**Figura 29**).

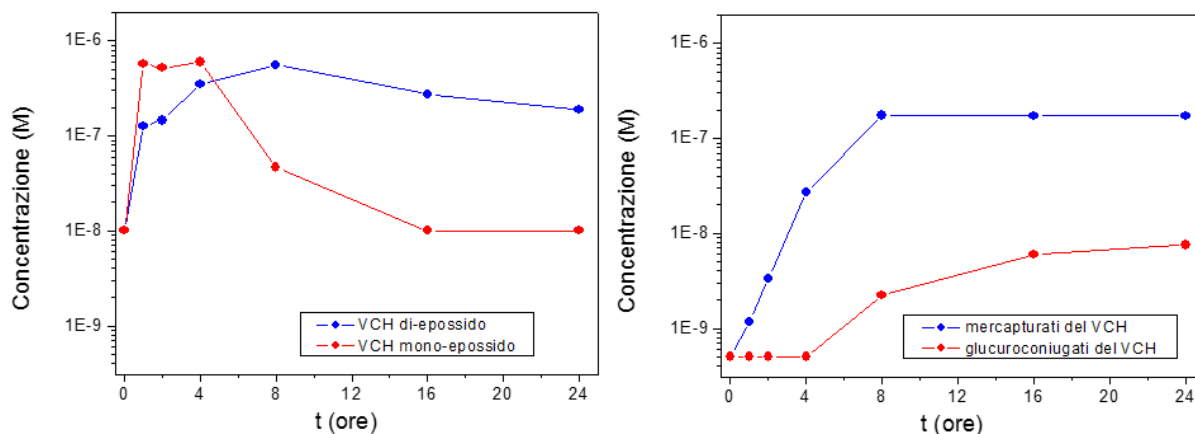


Figura 29. Concentrazione nel tempo dei metaboliti di fase I e di fase II a livello del medium cellulare della linea epatica.

I primi risultati mostrano anche in questo caso, come la concentrazione reale sia inferiore rispetto alla concentrazione nominale, in quanto la concentrazione nominale di VCH con cui era stata trattata la linea epatica era di 5 mM corrispondendo ad una concentrazione reale di VCH, calcolata, di 10^{-4} M. Inoltre, siamo andati a calcolare nello specifico le concentrazioni dei metaboliti nel tempo, e come atteso, osservando l'andamento della concentrazione nel tempo si evince che il primo metabolita che si forma sia 1,2-VCHME, in un secondo momento si osserva la formazione del VCD e dei metaboliti coniugati provenienti dal monoepossido, in particolare i mercapturati e i glucuro-coniugati. Inoltre, si evince come le concentrazioni del 1,2-VCHME, del VCD e dei mercapturati siano di tre ordini di grandezza inferiori rispetto alle concentrazioni iniziali di VCH, e i glucuro-coniugati siano di quattro ordini di grandezza inferiori rispetto alle concentrazioni iniziali di VCH.

4.4.3.5 Curve di vitalità dei metaboliti del VCH

Successivamente all'identificazione dei metaboliti del VCH, abbiamo valutato le curve concentrazione-risposta delle linee cellulari A549 (**Figura 30**), HepG2 (**Figura 31**), TM3 (**Figura 32**) e TM4 (**Figura 33**) trattate per 24 ore con i metaboliti del VCH, ovvero il VCD e 1,2-VCHME per calcolare l' IC_{50} e valutare gli effetti concentrazione/risposta.

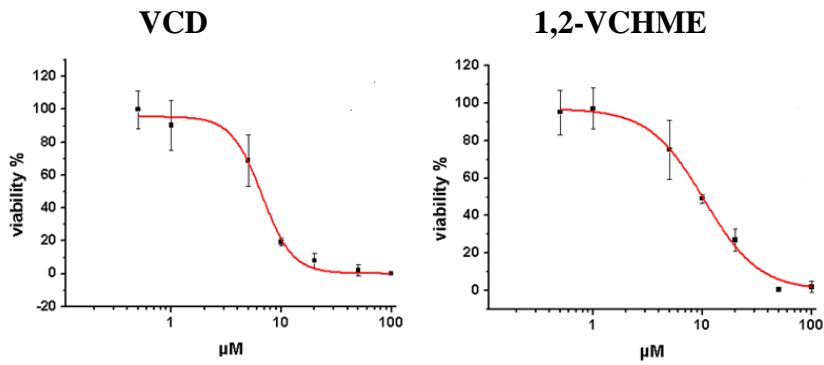


Figura 30. Curva concentrazione-risposta della linea cellulare A549 trattate con VCD e 1,2-VCHME.

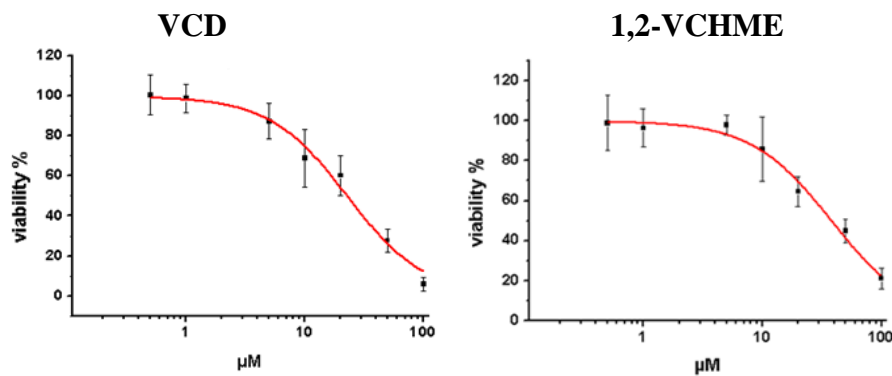


Figura 31. Curva concentrazione-risposta della linea cellulare HepG2 trattate con VCD e 1,2-VCHME.

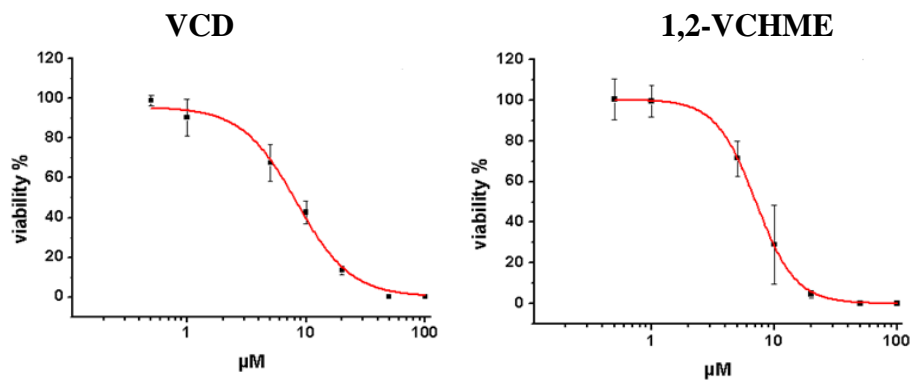


Figura 32. Curva concentrazione-risposta della linea cellulare TM3 trattate con VCD e 1,2-VCHME.

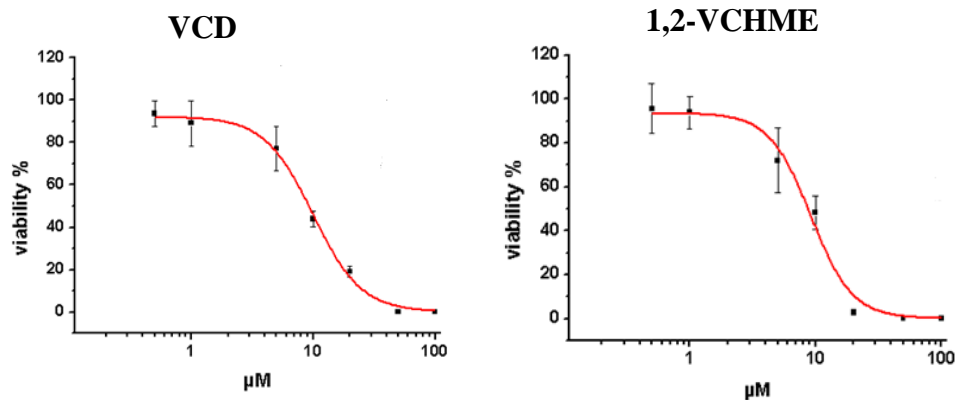


Figura 33. Curva concentrazione-risposta della linea cellulare TM4 trattate con VCD e 1,2-VCHME.

4.4.3.6 Determinazione dei valori di Benchmark Dose e Lower Benchmark Dose per i metaboliti del VCH

In seguito alle curve concentrazione-risposta e al calcolo del valore dell'IC₅₀ abbiamo calcolato anche per i metaboliti del VCH, l'1,2-VCHME e VCD, i corrispettivi valori di IC₁₀ e di BMDL₁₀ nelle diverse linee testate, in questo caso nella linea polmonare, nella linea epatica e nelle due linee cellulari testicolari.

La linea A549 trattata con VCD presenta un valore di IC₅₀ di 6.68 µM e un IC₅₀ di 10.40 µM per l'1,2-VCHME. La linea cellulare HepG2 trattata con VCD e 1,2-VCHME presenta un IC₅₀ rispettivamente di 22.86 µM e 38.09 µM. La linea cellulare TM3 trattate con VCD e 1,2-VCHME presenta un IC₅₀ rispettivamente di 8.32 µM e 7.06 µM e la linea cellulare TM4 un IC₅₀ di 10 µM e 9.20 µM (**Tabella 18**). Risultati che evidenziano come gli effetti dei due metaboliti, nelle diverse linee cellulari testate, siano abbastanza sovrapponibili

	IC ₅₀ (μM)	IC ₁₀ (μM)	BMDL ₁₀ (μM)
A549 (POLMONARE)			
1,2-VCHME	10.40 (ES: 0.4)	2.9	2
VCD	6.68 (ES: 0.4)	1.3	0.8
HepG2 (EPATICA)			
1,2-VCHME	38.09 (ES: 4)	7.2	4.7
VCD	22.86 (ES: 3)	4.5	3
TM3 (CELLULE DI LEYDIG)			
1,2-VCHME	7.06 (ES: 0,1)	3.4	2.6
VCD	8.32 (ES: 0.6)	2.8	2.1
TM4 (CELLULE DEL SERTOLI)			
1,2-VCHME	9.2 (ES: 0.8)	6.2	4.4
VCD	10.00 (ES: 0.4)	3.4	2.7

Tabella 18. Valori di IC₅₀, IC₁₀, BMDL₁₀ delle diverse linee trattate con i metaboliti del VCH.

4.5 DISCUSSIONE

Nel corso del ventesimo secolo il mondo in cui viviamo ha vissuto un'esplosione tecnologica e industriale senza precedenti che ha avuto però diverse conseguenze negative, tra cui un rischio sempre crescente derivante dagli effetti dei prodotti chimici e dalle svariate attività derivanti dall'industria. Fra i svariati effetti negativi di tali xenobiotici e attività industriali, spesso le conseguenze possono essere a carico dell'apparato riproduttivo. Inoltre, l'esposizione a sostanze chimiche nell'ambiente di vita e di lavoro e negli alimenti, ha un posto di rilievo fra i fattori di rischio per la salute riproduttiva, e non solo, per di più è da considerare l'insufficienza delle conoscenze scientifiche disponibili per un'efficace prevenzione.

Nel caso specifico, per quanto riguarda gli effetti del VCH, svariati studi *in vivo* hanno documentato la comparsa di tumori ovarici in topi e ratti di sesso femminile (Smith *et al.*, 1990; Jodi *et al.*, 2006). Il ruolo del VCH è stato associato nel provocare la perdita selettiva dei follicoli primordiali accelerando in questo modo il naturale processo di atresia dei follicoli, causando una menopausa precoce (Hu *et al.*, 2011; Hassah *et al.*, 2015). Da precisare, che questa azione ovotossica è da associare al suo metabolita, ovvero il VCD (Hoyer *et al.*, 2001). Di conseguenza, questo è un aspetto fondamentale da studiare, in quanto la menopausa precoce nelle donne comporta un maggiore rischio nell'insorgenza di diverse malattie associate alla menopausa (Hooser *et al.*, 1994). Inoltre, non vi sono ulteriori studi in letteratura che abbiano valutato ulteriori effetti, o che abbiano approfondito il suo metabolismo, soprattutto per quanto riguarda i metaboliti di fase II. Ulteriormente, non vi sono delle delucidazioni inerenti ai limiti di TLV-TWA proposti per il VCH dall'ACGIH, pari a 0.1 ppm, decisamente inferiori rispetto al suo precursore l'1,3-Butadiene, certo cancerogeno per l'uomo, con dei valori di TLV pari a 2 ppm. Oltre a ciò, un punto fondamentale per il VCH, classificato come possibile cancerogeno per l'uomo (IARC, 1994), è rappresentato dalla mancanza di indicatori biologici di esposizione (IBE). Di conseguenza risulta difficile la valutazione del rischio di esposizione dei lavoratori e la messa in atto di adeguati sistemi di prevenzione e protezione. In ultimo, vista la numerosità delle

diverse industrie che utilizzano tale sostanza, risulta fondamentale approfondire le conoscenze in merito agli effetti di tale xenobiotico.

Il trattamento delle diverse linee cellulari, nel nostro studio, ha evidenziato come il VCH possa avere degli effetti soprattutto a livello della linea polmonare (IC₅₀ 5.2 mM), leucemica (IC₅₀ 4.8 mM) e a livello delle linee testicolari (TM3 IC₅₀ 3.64 mM, TM4 IC₅₀ 3.15 mM). Questo dato potrebbe essere associato alla mancanza di validi sistemi di metabolizzazione in tali linee, a differenza della linea epatica in cui gli effetti si osservano in seguito a delle concentrazioni decisamente maggiori (IC₅₀ >10 mM). Questo evidenzia a livello della linea epatica la presenza di sistemi enzimatici in grado di metabolizzare e detossificare il VCH. Risultato confermato anche dai dati di letteratura che evidenziano come il VCH venga metabolizzato in maggior misura all'interno del fegato (Keller *et al.*, 1997).

Inoltre, indagando sugli effetti a livello cellulare abbiamo osservato come l'esposizione di tale xenobiotico provochi a una riduzione del numero delle cellule, con un effetto citostatico. Approfondendo lo studio dell'espressione genica delle diverse cicline e chinasi ciclina-dipendenti coinvolte nella progressione del ciclo cellulare, abbiamo osservato una ipo-espressione di queste proteine. I risultati erano statisticamente significativi per diverse proteine indagate (CDK4 p<0.001 alle 24 ore, la CDK6 p<0.0001 alle 2 e 4 ore, p<0.001 alle 24 ore, la CDK2 p<0.005 alle 24 ore, e la CCNE1 p<0.001 alle 2 ore, p<0.005 alle 4 ore, p<0.0001 alle 24 ore). Al contrario, p-21, la proteina responsabile dell'inibizione dell'espressione delle chinasi ciclina-dipendenti, risultava iper-espressa rispetto al controllo in modo significativo (p<0.005 alle 2 ore, p<0.0001 alle 4 ore, p<0.001 alle 24 ore). Questo evidenzia come il blocco del ciclo cellulare nelle prime fasi di replicazione sia da associare alla iper-espressione di questa proteina. I dati in letteratura evidenziano come la regolazione del ciclo cellulare sia strettamente controllata da chinasi che dipendono da cicline (CDKs), rappresentando i “*partners*” catalitici e la proteina p-21 sia utilizzata dalle cellule nel processo di riparazione del DNA indotti da agenti chimici e fisici, in quanto è in grado di localizzarsi in tempi rapidissimi nei siti dove è avvenuto

il danno (Abbas *et al.*, 2009). Inoltre, questa proteina era già nota per la sua capacità di bloccare la proliferazione cellulare in seguito all'esposizione ad agenti che danneggiano il DNA, un sistema con cui le cellule del nostro organismo "prendono tempo" per riparare tali danni ed evitare che possibili mutazioni del DNA trasformino la cellula normale in tumorale (Almond *et al.*, 2002). L'identificazione di questo nuovo comportamento della proteina, però, implica la sua diretta partecipazione al processo di riparazione e quindi alla difesa contro gli agenti cancerogeni (Zhang *et al.*, 2015).

Inoltre, studi pregressi condotti dal nostro laboratorio, avevano evidenziato come l'utilizzo dei modelli *in vitro* per lo studio delle sostanze volatili comporti una notevole differenza fra la concentrazione sperimentale utilizzata e la concentrazione reale misurata nel tempo a livello del medium e delle cellule (Poli *et al.*, 2004). Di conseguenza, essendo il VCH una molecola volatile, abbiamo voluto indagare tale aspetto anche in questo studio. I nostri risultati evidenziano come la concentrazione reale sia inferiore rispetto alla concentrazione nominale. Questa discordanza è stata verificata utilizzando sia un sistema aperto sia un sistema chiuso, in cui veniva utilizzato un terreno CO₂ indipendente. Però fra i due sistemi vi è una differenza, ovvero mentre nel sistema aperto si assiste a una drastica riduzione della concentrazione reale nel medium e della concentrazione reale assorbita dalle cellule sia al tempo zero che nel tempo, nel sistema chiuso si assiste ad una riduzione in una prima fase, effetti dovuti molto probabilmente all'evaporazione, fino al raggiungimento di uno stato stazionario che corrisponde al raggiungimento di un equilibrio, sia a livello del medium che a livello dell'assorbimento da parte delle cellule, tra la fase liquida e la fase gassosa. Di conseguenza, possiamo affermare che il sistema chiuso rappresenta un sistema di coltivazione cellulare migliore rispetto al sistema aperto per le indagini di sostanze volatili. Infatti, rappresenta un sistema in cui si limita notevolmente l'eliminazione/riduzione della dispersione del VCH nell'ambiente esterno, forzando in questo modo l'assorbimento da parte delle cellule. La discordanza delle due concentrazioni è stata confermata anche dallo studio del coefficiente di ripartizione medium/aria

e dalla cinetica di evaporazione. I risultati ottenuti dal coefficiente di ripartizione medium/aria evidenziano come il VCH abbia un'affinità doppia per l'aria rispetto al medium ($\lambda_{m/a}= 0.51$), confermando la tendenza dell'evaporazione da parte del VCH. Valutando la cinetica di evaporazione, del primo ordine, abbiamo potuto calcolare il tempo di dimezzamento del VCH per i tempi brevi (sistema chiuso $t_{1/2}=12.7\text{min}$), evidenziando come in 12.7 minuti nel medium cellulare abbiamo la metà della concentrazione iniziale di VCH.

Ulteriormente, in seguito all'identificazione dei metaboliti di fase I, mediante analisi in GC-MS, e di fase II, analisi in LC-MS/MS, abbiamo valutato la loro concentrazione nel tempo a livello del medium cellulare. I primi risultati evidenziano come la concentrazione reale di VCH (10^{-4} M) sia decisamente inferiore rispetto alla concentrazione nominale (5mM). La dose effettiva di VCH a livello cellulare è quindi decisamente più bassa rispetto alla dose nominale.

Inoltre, abbiamo verificato come le concentrazioni dei metaboliti di fase I, 1,2-VCHME e VCD, e di fase II, mercapturati, siano di tre ordini di grandezza inferiori rispetto alla concentrazione iniziale di VCH, e di quattro ordini di grandezza inferiori per quando riguarda i glicuroconiugati. Risultato confermato anche dalle rispettive curve concentrazione-risposta, in cui si evince che gli effetti precoci siano nell'ordine dei μM per gli intermedi mono- e di-eossido (1,2-VCHME 10.40 μM , VCD 6.68 μM per le A549; 1,2-VCHME 38.09 μM , VCD 22.86 μM per le HepG2) rispetto al VCH in cui si osservano effetti nell'ordine del mM (VCH 5.2 mM per le A549; VCH >10 mM per le HepG2). Questi dati evidenziano come i metaboliti di fase I siano di tre ordini di grandezza più tossici a livello cellulare rispetto al VCH, di conseguenza sono probabilmente i maggiori responsabili della tossicità del VCH. Questo effetto deriva dalla forte reattività strutturale degli epossidi che essendo delle molecole poco stabili, reagiscono con i sistemi biologici (es. DNA, proteine, ecc.) causando danno cellulare. Nel caso del VCH, gli effetti tossici, dovuti principalmente al mono- e di-eossido, risultano minori probabilmente per l'intervento di sistemi di metabolizzazione di secondo ordine (glucuro-, solfo-coniugazione,

reazione con GSH, ecc.) che agiscono con effetto detossificante diminuendo così la quota libera di epossidi in grado di indurre danno cellulare (**Figura 34**).

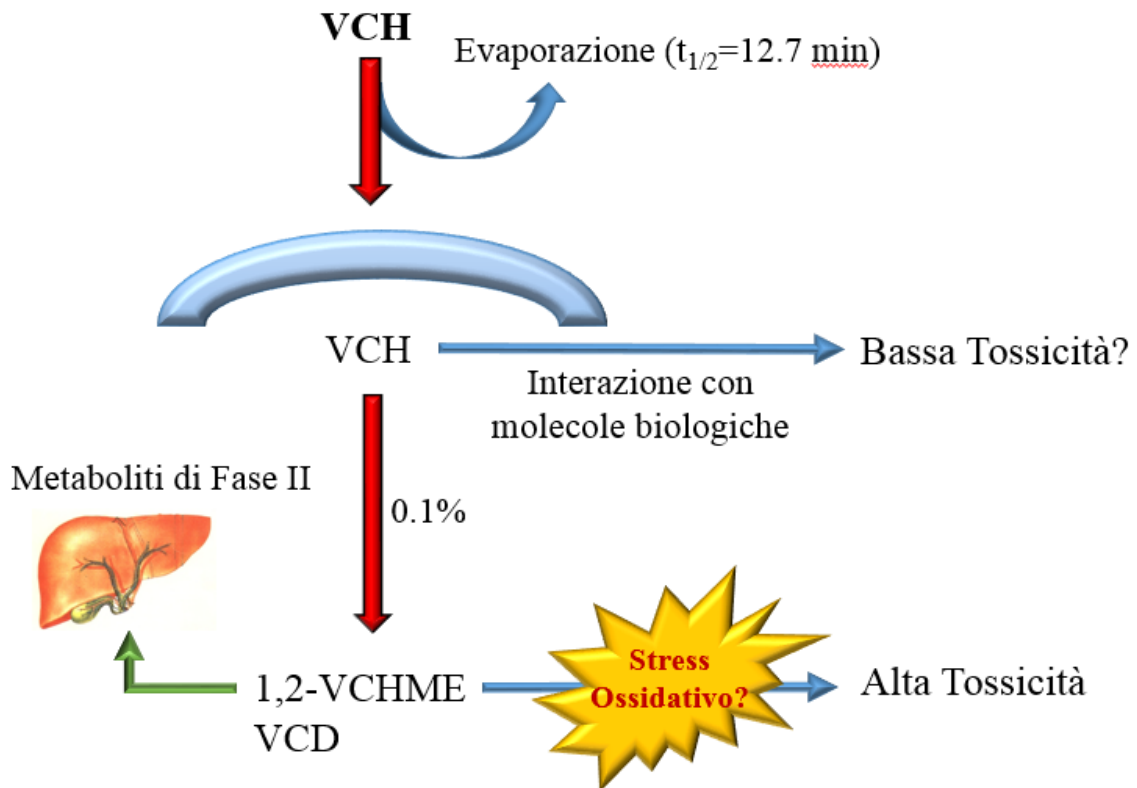


Figura 34. Il VCH viene assorbito dalle cellule (arco azzurro) e circa lo 0.1% si trasforma negli epossidi (1,2-VCHME e VCD).

I possibili effetti citotossici dei metaboliti del VCH, potrebbero essere rappresentati da svariati processi di infiammazione e alterazione dell'equilibrio redox causando anomalie nelle funzioni e, talvolta, morte cellulare. Lo stress ossidativo è infatti una condizione determinata dalla mancanza di equilibrio tra produzione e manifestazione di radicali liberi all'interno della cellula e la capacità dei sistemi biologici di detossificare rapidamente gli intermedi reattivi citotossici prodotti o di riparare il danno cellulare (**Figura 34**). Questa massiccia produzione di specie radicaliche reattive, che travolge il sistema di difesa rappresentato dagli enzimi antiossidanti, può essere indotta da cause endogene o esogene e può provocare l'ossidazione delle biomolecole cellulari (Valko *et al.*, 2006). Il processo coinvolge una quantità considerevole di molecole,

reazioni chimiche ed interazioni cellulari. Stiamo attualmente svolgendo degli studi per verificare tale ipotesi.

4.6 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

La prima parte di questo studio *in vitro* ha evidenziato, sui modelli cellulari studiati, che il VCH anche alle concentrazioni più elevate non provoca evidenti danni cellulari o lisi, né per apoptosi né per necrosi, bensì si evince solo una riduzione del numero delle cellule. Nelle linee cellulari più sensibili sono stati osservati effetti citostatici, risultato confermato anche dalle alterazioni del ciclo cellulare nelle diverse fasi e dalla ipo-espressione delle diverse proteine coinvolte nelle prime fasi del ciclo cellulare. La linea epatica, a differenza delle altre linee cellulari studiate, risulta essere meno sensibile agli effetti del VCH e dei suoi metaboliti, risultato che potrebbe evidenziare una maggiore capacità nel metabolizzare lo xenobiotico in quanto possiede diversi sistemi enzimatici in grado di intervenire di fronte alle situazioni avverse. Di conseguenza questi risultati evidenziano come differenti linee cellulari, con un diverso metabolismo, affrontano in modo eterogeneo lo stress in seguito alla esposizione degli xenobiotici.

I risultati ottenuti dalla esposizione ai metaboliti di fase I del VCH, ovvero l'1,2-VCHME e il VCD, a differenza della esposizione diretta al VCH, evidenziano morte cellulare in tutte le linee cellulari investigate (polmonare, epatiche, testicolari). Questo effetto viene confermato anche dal valore di IC_{50} di 3 ordini di grandezza inferiore a quello del VCH.

Inoltre, le analisi in gas cromatografia/spettrometria di massa hanno evidenziato come la concentrazione reale a cui le cellule sono esposte sia drasticamente inferiore a quella nominale a causa di importanti effetti dovuti all'evaporazione e assorbimento cellulare. Questo risultato è importante perché evidenzia una tossicità reale degli xenobiotici superiore a quella calcolata sulla base della dose nominale rendendo così necessario un calcolo più puntuale dell' IC_{50} e della BMD.

Attualmente stiamo valutando la tossicità del VCH mediante lo studio *in vivo*, utilizzando i ratti. In una prima fase abbiamo esposto i ratti a una singola dose di VCH per completare l'identificazione del VCH e dei suoi metaboliti in campioni di urina. In un secondo *step* abbiamo esposto i ratti a dosi differenti di VCH per studiare la biodistribuzione nei diversi organi. A tal fine, in seguito al trattamento gli animali sono stati sacrificati e cervello, polmoni, cuore, fegato, reni, tessuto adiposo, testicoli sono stati raccolti. Inoltre, abbiamo raccolto anche i campioni di urine in diversi tempi dal trattamento, per effettuare l'identificazione di possibili metaboliti di esposizione a VCH e valutare il tempo di raccolta delle urine. Lo scopo finale del lavoro è quello infatti di poter proporre degli adeguati indicatori biologici di esposizione professionale a VCH da correlare ai rispettivi valori limiti ambientali (TLV-TWA).

5. BIBLIOGRAFIA

Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jun;9(6):400-14.

ACGIH. 2001. 4-Vinyl cyclohexene. 7th ed, American Conference of Governmental Industrial Hygienists Documentation of the Threshold Limit Values. Cincinnati, Ohio: ACGIH Worldwide.

ACGIH. 1995. 4-Vinylcyclohexene. Documentation of threshold limit values and biological exposure indices, ACGIH, Cincinnati, Ohio.

ACGIH. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 2004. Threshold Limit Values (TLV®s) for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices (BEIs). Cincinnati, OH.

Albini E. (2009), “Il radon negli edifici e nell’ ambiente e luogo di lavoro”.

Albrand G, Biron E, Boucot I, et al. (2007), “Lung cancer in the elderly subjects”. *Rev Mal Respir* 24: 703-23.

Alimardanov KH. M., Velieva F. M., Dzhililova AA., and Ragimova NM., “Fundamental kinetic aspects and the mechanism of oxidative dehydrogenation of 4-vinylcyclohexene to give ethylbenzene and styrene”, *Theoretical and experimental chemistry*, Vol. 49, 2013.

Al-Kattan K, Sepas E, Fountain SW, Townsend ER. (1997), “Disease recurrence after resection for stage I lung cancer”. *Eur J Cardiothorac Surg*;12:380-384.

Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia*. 2002 Apr;16(4):433-43.

Amorim LC, de L Cardeal Z. Breath air analysis and its use as a biomarker in biological monitoring of occupational and environmental exposure to chemical agents. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 Jun 15;853(1-2):1-9.

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

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

Andriani F, Conte D, Mastrangelo T, Leon M, Ratcliffe C, Roz L, Pelosi G, Goldstraw P, Sozzi G, Pastorino U. Detecting lung cancer in plasma with the use of multiple genetic markers. *Int J Cancer* 2004; 108(1):91-96.

Anger J, Ewers U, Wilhelm M. 2007. Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health* 210,201-228.

Antczak A, Kharitonov SA, Montuschi P, Gorski P, Barnes PJ. Inflammatory response to sputum induction measured by exhaled markers. *Respiration*. 2005 Nov-Dec;72(6):594-9.

Apostoli P, Bergonzi R, Catalani S, Neri G. e al. Nuovi indicatori di esposizione. *G Ital Med Lav Erg* 2004; 26:4, 278-297.

Bach PB, Jett JR, Pastorino U, Tockman MS, Swensen SJ, Begg CB. Computed tomography screening and lung cancer outcomes. *JAMA* 2007; 297: 953-61.

Badwe RA. Lung cancer mortality in the Mayo Lung Project: impact of extended follow-up. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 321-3.

Barry KH, Zhang Y, Lan Q, Zahm SH, Holford TR, Leaderer B, Boyle P, Hosgood HD 3rd, Chanock S, Yeager M, Rothman N, Zheng T. Genetic variation in metabolic genes, occupational solvent exposure, and risk of non-hodgkin lymphoma. *Am J Epidemiol*. 2011 Feb 15;173(4):404-13.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97.

Bergamaschi E, Brustolin A, De Palma G, Manini P, Mozzoni P, Andreoli R, Cavazzini S, Mutti A. Biomarkers of dose and susceptibility in cyclists exposed to monoaromatic hydrocarbons. *Toxicol Lett.* 1999 Sep 5;108(2-3):241-7.

Bevan C, M Gargas, C Kirman, J Vergnes. 2009. Mode of action (MOA) evaluation and derivation of a cancer and non-cancer reference value for 4-vinylcyclohexene. Abstract No. 839. In Society of Toxicology. Baltimore, M.D.

Bevan C, DA Keller, AS Panepinto, KS Bentley. 2001. Effect of 4-vinylcyclohexene on micronucleus formation in the bone marrow of rats and mice. *Drug Chem Toxicol* 24 (3):273-85.

Bevan C, Stadler JC, Elliott GS, Frame SR, Baldwin JK, Leung HW, Moran E, Panepinto AS (1996) Subchronic toxicity of 4-vinylcyclohexene in rats and mice by inhalation exposure. *Fundam Appl Toxicol* 32: 1–10.

Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, Ladd C, Beheshti J, Bueno R, Gillette M, Loda M, Weber G, Mark EJ, Lander ES, Wong W, Johnson BE, Golub TR, Sugarbaker DJ, Meyerson M. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(24):13790-13795.

Bhattacharya P, Sen N, Hoyer PB, Keating AF. Ovarian expressed microsomal epoxide hydrolase: role in detoxification of 4-vinylcyclohexene diepoxide and regulation by phosphatidylinositol-3 kinase signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012 Jan 1;258(1):118-23.

Bisceglie F, Pinelli S, Alinovi R, Goldoni M, Mutti A, Camerini A, Piola L, Tarasconi, Pelosi G. “Cinnamaldehyde and cuminaldehyde thiosemicarbazones and their copper(II) and nickel(II) complexes: A study to understand their biological activity.” *Journal of Inorganic Biochemistry*, 140:111–125. 2014.

Bisset RJ, McLaughlin Jr. North Eastern Ontario Regional Cancer Centre, Sudbury, Ontario,(2010).

Bittner RC, Felix R. Magnetic resonance (MR) imaging of the chest: state-of-the-art. *Eur Respir J* 1998, 11,1392-1404.

Bloemen K, Lissens G, Desager K, Schoeters G. Determinants of variability of protein content, volume and pH of exhaled breath condensate. *Respir Med*. 2007 Jun;101(6):1331-7.

Boeri M, Verri C, Conte D, Roz L, Modena P, Facchinetti F, Calabrò E, Croce CM, Pastorino U, Sozzi G. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 1;108(9):3713-8.

Bollati V, Baccarelli A, Hou L, Bonzini M, Fustinoni S, Cavallo D, Byun HM, Jiang J, Marinelli B, Pesatori AC, Bertazzi PA, Yang AS. Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene. *Cancer Res*. 2007 Feb 1;67(3):876-80.

Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathway: roadmap for therapies. *Eur Respir J* 2009; 33:1485-1497; Risch A, Plass C. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer* 2008 Jul 1;123:1-7.

Briff RS, Lynch J, Bernath T, Scala RA, 1980. Benzene in the workplace. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J*. 41: 616-623.

Buthbumrung N, Mahidol C, Navasumrit P, Promvijit J, Hunsonti P, Autrup H, Ruchirawat M. Oxidative DNA damage and influence of genetic polymorphisms among urban and rural schoolchildren exposed to benzene. *Chem Biol Interact*. 2008 Apr 15;172(3):185-94.

Campagna M, Satta G, Campo L, Flore V, Ibba A, Meloni M, Tocco MG, Avataneo G, Flore C, Fustinoni S, Cocco P. Analysis of potential influence factors on background urinary benzene concentration among a non-smoking, non-occupationally exposed general population sample. *Int Arch Occup Environ Health*. 2014;87(7):793-9.

Carpagnano GE, Palladino GP, Gramiccioni C, Foschino Barbaro MP, Martinelli D. Lung Cancer. *Epub* 2010 Feb 25. Exhaled ERCC-1 and ERCC-2 microsatellite alterations in NSCLC patients. 2010 May;68(2):305-7.

Chan HP, Tran V, Lewis C, Thomas PS. Elevated levels of oxidative stress markers in exhaled breath condensate. *J Thorac Oncol*. 2009 Feb;4(2):172-8.

Chen HY, Yu SL, Chen CH, Chang GC, Chen CY, Yuan A, Cheng CL, Wang CH, Terng HJ, Kao SF, Chan WK, Li HN, Liu CC, Singh S, Chen WJ, Chen JJ, Yang PC. A five-gene signature and clinical outcome in non-small cell lung cancer, 2007, *N Engl J Med* 356,11-20.

Chiappe C, De Rubertis A, De Carlo M, Amato G, Gervasi PG. Stereochemical aspects in the 4-vinylcyclohexene biotransformation with rat liver microsomes and purified p450s. monoepoxides and diols. *Chem Res Toxicol*. 2001 May;14(5):492-9.

Corradi M, Mutti A. Exhaled breath analysis: from occupational to respiratory medicine. *Acta Biomed*. 2005;76 Suppl 2:20-9.

Cuk K, Zucknick M, Heil J, Madhavan D, Schott S, Turchinovich A, Arlt D, Rath M, Sohn C, Benner A, Junkermann H, Schneeweiss A, Burwinkel B. Circulating microRNAs in plasma as early detection markers for breast cancer. *Int J Cancer*. 2012 Aug 28.

Cannady EA, CA Dyer, PJ Christian, IG Sipes, PB Hoyer. 2002. Expression and activity of microsomal epoxide hydrolase in follicles isolated from mouse ovaries. *Toxicol Sci* 68:22-31.

Cannady EA, CA Dyer, PJ Christian, IG Sipes, PB Hoyer. 2003. Expression and activity of cytochromes P450 2E1, 2A, and 2B in the mouse ovary: the effect of 4-vinylcyclohexene and its diepoxide metabolite. *Toxicol Sci* 73 (2):423-30.

Catelinois O, Rogel A, Laurier D. Lung cancer attributable to indoor radon exposure in France: impact of the risk models and uncertainly analysis. *Environ. Health Perspect*. 2006; 114 (9): 1361-6.

Collins JJ, Montali RJ, Manus AG. 1987. Toxicological evaluation of 4-vinylcyclohexene. II. Induction of ovarian tumors in female B6C3F1 mice by chronic oral administration of 4-vinylcyclohexene. *J Toxicol Environ Health* 21: 507-524

De Angelis R, Sant M, Coleman MP, Francisci S, Baili P, Pierannunzio D, Trama A, Visser O, Brenner H, Ardanaz E, Bielska-Lasota M, Engholm G, Nennecke A, Siesling S, Berrino F, Capocaccia R; EUROCORE-5 Working Group. Cancer survival in Europe 1999-2007 by country and age: results of EUROCORE-5-a population-based study. *Lancet Oncol*. 2014 Jan;15(1):23-34.

DeLeve LD, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther*. 1991 Dec;52(3):287-305.

De Palma G, Poli D, Manini P, Andreoli R, Mozzoni P, Apostoli P, Mutti A. Biomarkers of exposure to aromatic hydrocarbons and methyl tert-butyl ether in petrol station workers. *Biomarkers*. 2012 Jun;17(4):343-51.

De Palma. Nuovi indicatori molecolari per la prevenzione della patologia tumorale e degenerativa: la metilazione anomala del DNA. *G Ital Med Lav Erg* 2009; 31: 51-53.

Destro A, Bianchi P, Alloisio M, Laghi L, Di Gioia S, Malesci A, Cariboni U, Gribaudo G, Bulfamante G, Marchetti A, Bosari S, Infante M, Ravasi G, Roncalli M. K-ras and p16 (INK4A) alterations in sputum of NSCLC patients and in heavy asymptomatic chronic smokers. *Lung Cancer* 2004; 44(1):23-32.

Devine PJ, IG Sipes, PB Hoyer. 2001. Effect of 4-vinylcyclohexene diepoxide dosing in rats on GSH levels in liver and ovaries. *Toxicol Sci* 62 (2):315-20.

Devine PJ, IG Sipes, PB Hoyer. 2004. Initiation of delayed ovotoxicity by in vitro and in vivo exposures of rat ovaries to 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol* 19 (1):71-7.

De Mello RA, Marques DS, Medeiros R, Araújo AM. Epidermal growth factor receptor and K-Ras in non-small cell lung cancer-molecular pathways involved and targeted therapies. *World J Clin Oncol*. 2011 Nov 10;2(11):367-76.

Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol*. 2014;32(6):579-86.

Diosdado B, van de Wiel MA, Terhaar Sive Droste JS, Mongera S, Postma C, Meijerink WJ, Carvalho B, Meijer GA. MiR-17-92 cluster is associated with 13q gain and c-myc expression during colorectal adenoma to adenocarcinoma progression. *Br J Cancer*. 2009 Aug 18;101(4):707-14.

Doerr JK, SB Hooser, BJ Smith, IG Sipes. 1995. Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene and related olefins in B6C3F1 mice: role of diepoxides. *Chem Res Toxicol* 8 (7):963-9.

Doerr JK, IG Sipes. 1996. Ovarian toxicity and metabolism of 4-vinylcyclohexene and analogues in B6C3F1 mice: structure-activity study of 4-vinylcyclohexene and analogues. *Adv Exp Med Biol* 387:377-84.

Douillard JY, et al. Gefitinib treatment in EGFR mutated Caucasian NSCLC: circulating-free tumor DNA as a surrogate for determination of EGFR status. *J Thorac Oncol*. 2014; 9(9):1345-53.

Dyer CA, Raymond-Whish S, Schmuki S, Fisher T, Pyzyna B, Mayer LP, “Accelerated follicle depletion in vitro and in vivo in Sprague-Dawley rats Using the combination of 4-vinylcyclohexene diepoxide and triptolide”, Vo. 44, 2013.

Edwards DA, Man JC, Brand P, Katstra JP, Sommerer K, Stone HA, Nardell E, Scheuch G. Inhaling to mitigate exhaled bioaerosols. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Dec 14;101(50):17383-8.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1374-403.

Feskanich D, Ziegler RG, Michaud DS, et al: Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J Natl Cancer Inst*, 2000, 92:1812-1823.

Fingerhut M, Nelson DI, Driscoll T, Concha-Barrientos M, Steenland K, Punnett L, Pruss-Ustun A, Leigh J, Corvalan C, Eijkemans G, Takala J. The contribution of occupational risks to the global burden of disease: summary and next steps. 2006, 97(2):313-21.

Flaws JA, Doerr JK, Sipes IG, Hoyer PB. 1994. Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol* 8: 509–514

Fontaine SM, PB Hoyer, JR Halpert, IG Sipes. 2001. Role of induction of specific hepatic cytochrome P450 isoforms in epoxidation of 4-vinylcyclohexene. *Drug Metab Dispos* 29 (9):1236-42.

Foley DL, Craig JM, Morley R, Olsson CA, Dwyer T, Smith K, Saffery R. Prospects for epigenetic epidemiology. *Am J Epidemiol*. 2009 Feb 15;169(4):389-400. doi: 10.1093/aje/kwn380. Epub 2009 Jan 12. Review. Erratum in: *Am J Epidemiol*. 2009 Jun 1;169(11):1409.

Fontana RS. The Mayo Lung Project: a perspective. *Cancer* 2000; 89: 2352-5.

Franco R, Schoneveld, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Letters* 2008; 266: 6-11.

Fustinoni S, Consonni D, Campo L, Buratti M, Colombi A, Pesatori AC, Bonzini M, Bertazzi PA, Foa` V, Garte S, Farmer PB, Levy LS, Pala M, Valerio F, Fontana V, Desideri A, Merlo DF. Monitoring Low Benzene Exposure: Comparative Evaluation of Urinary Biomarkers, Influence of Cigarette Smoking, and Genetic Polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2005. 14: 2237-44.

Galbraith D, Gross SA, Paustenbach D. Benzene and human health: A historical review and appraisal of associations with various diseases. *Crit Rev Toxicol*. 2010 Nov;40 Suppl 2:1-46.

Ghittori S, Imbriani M. S-phenylmercapturic acid in urine as a biomarker of environmental benzene exposure, in Mercapturic acid as biomarker of exposure to industrial chemicals, Maugeri Foundation books, 2001; 2: 85.

Glass DC, Gray CN, Jolley DJ, Gibbons C, Sim MR, Fritschi L, Adams GG, Bisby JA, Manuell R. Leukemia risk associated with low-level benzene exposure. *Epidemiology*. 2003 Sep;14(5):569-77.

Greenberg AK., Lee M.S. Biomarkers for lung cancer: clinical uses. *Curr Opin Pulm Med* 2007; 13: 249-255.

Goldoni M, Vettori MV, Alinovi R, Caglieri A, Ceccatelli S, Mutti A. Models of neurotoxicity: extrapolation of Benchmark Dose in vitro”, *Risk analysis*, Vol. 23, No. 3, 2003.

Goldoni M, Caglieri A, Andreoli R, Poli D, Manini P, Vettori MV, Corradi M, Mutti A. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulm Med* 2005, 1;5:10.

Grizzle TB, JD George, PA Fail, JC Seely, JJ Heindel. 1994. Reproductive effects of 4-vinylcyclohexene in Swiss mice assessed by a continuous breeding protocol. *Fundam Appl Toxicol* 22 (1):122-9.

Hammond EC, Selikoff IJ, Seidman H: Asbestos exposure, cigarette smoking and death rates. *Ann N Y Acad Sci* 1979 330:473-90.

Hassan T, McKiernan PJ, McElvaney NG, Cryan SA, Greene CM. Therapeutic modulation of miRNA for the treatment of proinflammatory lung diseases. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012 Mar;10(3):359-68.

Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology.* 2000 Sep;61(3):154-66.

Hecht SS. Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol.* 2002; 3: 461–69.

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005 Mar 10;352(10):997-1003.

Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with

clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol*. 2008 Sep 1;26(25):4189-99.

Henschke CI. Early lung cancer action project: overall design and findings from baseline screening. *Cancer* 2000; 89:2474-82.

Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, Naidich DP, McGuinnes G, Miettinen OS, Libby DM, Pasmantier MW, Koizumi J, Altorki NK, Smith JP. Early lung cancer action project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet* 1999; 354:99-105.

Henschke CI, Yankelevitz DF, Libby DM, Pasmantier MW, Smith JP, Miettinen OS. Survival of patients with stage I lung cancer detected on CT screening. *N Engl J Med* 2006; 355: 1763-71.

Hill AV, 1910. The possible effects of the aggregations of molecules of haemoglobin on its dissociations curves. *J. Physiol* 40, iv-vii.

Hoet P, De Smedt E, Ferrari M, Imbriani M, Maestri L, Negri S, De Wilde P, Lison D, Haufroid V. Evaluation of urinary biomarkers of exposure to benzene: correlation with blood benzene and influence of confounding factors. *Int Arch Occup Environ Health*. 2009 Aug;82(8):985-95.

Hoffmann D, Hoffmann I, El Bayoumy K., The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L Wynder. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14: 767–90.

Hooser SB, Demerell DG, Douds DA, Hoyer P, Sipes IG (1995) Testicular germ cell toxicity caused by vinylcyclohexene diepoxide in mice. *Reprod Toxicol* 9 : 359–367

Hooser SB, Douds DP, DeMerell DG, Hoyer PB, Sipes IG (1994) Long-term ovarian and gonadotropin changes in mice exposed to 4-vinylcyclohexene. *Reprod Toxicol* 8: 315–323

Hooser SB, Parola LR, Van Ert MD, Sipes IG (1993) Differential ovotoxicity of 4-vinylcyclohexene and its analog, 4-phenylcyclohexene. *Toxicol Appl Pharmacol* 119: 302–305.

Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, Becher G, van Beurden WJ, Corradi M, Dekhuijzen R, Dweik RA, Dwyer T, Effros R, Erzurum S, Gaston B, Gessner C, Greening A, Ho LP, Hohlfeld J, Jöbbsis Q, Laskowski D, Loukides S, Marlin D, Montuschi P, Olin AC, Redington AE, Reinhold P, van Rensen EL, Rubinstein I, Silkoff P, Toren K, Vass G, Vogelberg C, Wirtz H; ATS/ERS Task Force on Exhaled Breath Condensate. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*. 2005 Sep;26(3):523-48.

Horvath I, Lazar Z, Gyulai N, Kollai M, Losonczy G. Exhaled biomarkers in lung cancer. *Eur Respir J*. 2009; 34: 261-275.

Hoyer PB, Devine PJ, Hu X, Thompson KE, Sipes G. Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: a mechanistic model. *Toxicologic Pathology*, Vo. 29, 2001.

Huff J. Carcinogenicity bioassays of bisphenol A, 4-vinylcyclohexene diepoxide, and 4-vinylcyclohexene. *Toxicol Sci*. 2001 Dec;64(2):282-3.

Hu X, P Christian, IG Sipes, PB Hoyer. 2001. Expression and redistribution of cellular Bad, Bax, and Bcl-xL protein is associated with VCD-induced ovotoxicity in rats. *Biol Reprod* 65:1489-1495.

Hu X, PJ Christian, KE Thompson, IG Sipes, PB Hoyer. 2001. Apoptosis induced in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide is associated with activation of the caspase cascades. *Biol Reprod* 65 (1):87-93.

Hung RJ. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 2008, 452(7187):633-7.

Hussain MU. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res*. 2012 Aug;349(2):405-13.

Hynes NE, MacDonald G. ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Apr;21(2):177-84.

IARC. 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 60, Some industrial chemicals , IARC, Lyon, 361–372.

IARC, Lyon France 2003. International Agency for Research on Cancer. Iarc Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Tobacco Smoking and Involuntary Smoking. Vol. 83.

IARC, Monographs 100-F Chemical Agents and Related Occupations, 2012.

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Chemical agents and related occupations. Benzene volume100f, 2012.

IPCS. Environmental Health Criteria n. 222: Biomarkers in risk assessment: Validity and validation. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, 2001.

Ilie M, Hofman V, Long E, Bordone O, et al. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? *Ann Transl Med.* 2014;2(11):107.

Inamura K, Fujiwara T, Hoshida Y, Isagawa T, Jones MH, Virtanen C, Shimane M, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Tsuchiya E, Ishikawa S, Aburatani H, Nomura H, Ishikawa Y . Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and non-negative matrix factorization. *Oncogene* 2005; 24(47):7105-7113.

Irie M, Tamae K, Iwamoto-Tanaka N, Kasai H. Occupational and lifestyle factors and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Sci.* 2005 Sep;96(9):600-6.

IUCLID.2006.IUCLIDDataset,20116390B:<http://www.epa.gov/chemrtk/pubs/summaries/4vinylhx/c16390rs.pdf>, accessed May 29, 2009.

Jakubowski M, Trzcinka-Ochocka M. 2005. Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *J occup Health* 47, 22-48.

Jamieson NB, Morran DC, Morton JP, Ali A, Dickson EJ, Carter CR, Sansom OJ, Evans TR, McKay CJ, Oien KA: MicroRNA molecular profiles associated with diagnosis clinicopathologic criteria, and overall survival in patients with resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2012, 18:534–545.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011.

Jung HM., Patel RS, Cohen DM, Jakymiw A, Kong WW, Cheng JQ, Chan EKL: Proceedings of the 103rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2012 Mar 31-Apr 4; Chicago, IL. *Cancer Res* 2012; 72 (8 Suppl).

Kappeler CJ and Hoyer PB. 4-vinylcyclohexene diepoxide: a model chemical for ovotoxicity. *Syst Biol Reprod Med.*, Vo. 58, 2012.

Keating AF, Rajapaksa KS, Sipes IG, Hoyer PB. Effect of CYP2E1 gene deletion in mice on expression of microsomal epoxide hydrolase in response to VCD exposure. *Toxicol Sci*. 2008 Oct;105(2):351-9.

Keller DA, SC Carpenter, SZ Cagen, FA Reitman. 1997. In vitro metabolism of 4-vinylcyclohexene in rat and mouse liver, lung, and ovary. *Toxicol Appl Pharmacol* 144: 36–44.

Keller DA. 1993. Partition coefficients of 4-vinylcyclohexene and metabolites, Haskell Laboratory Report No. 102-93. Newark, Delaware.

Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled biomarkers. *Chest*. 2006 Nov;130(5):1541-6.

Kim S, Vermeulen R, Waidyanatha S, Johnson BA, Lan Q, Smith MT, Zhang L, Li G, Shen M, Yin S, Rothman N, Rappaport SM. Modeling human metabolism of benzene following occupational and environmental exposures. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Nov;15(11):2246-52.

Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004; 239-267.

Kerr KM. Pulmonary preinvasive neoplasia. *J Clin Pathol.* 2001; 54:257-271.

Komatsu S, Ichikawa D, Takeshita H, Tsujiura M, Morimura R, Nagata H, Kosuga T, Iitaka D, Konishi H, Shiozaki A, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2011 Jun 28;105(1):104-11.

Lababede O, Meziane M., Rice T. Seventh edition of the cancer staging manual and stage grouping of lung cancer: quick reference chart and diagrams. *Chest* 2011; 139(1):183-9.

Lages E, Ipas H, Guttin A, Nesr H, Berger F, Issartel JP. MicroRNAs: molecular features and role in cancer. *Front Biosci.* 2012 Jun 1;17:2508-40.

Laitinen J, Kangas J, Pekari K. Short time exposure to benzene and gasoline at garages. *Chemosphere.* 1994 January28: 197-205.

Lam S, MacAulay C, leRiche JC, Palcic B. (2000). Detection and localization of early lung cancer by fluorescence bronchoscopy. *Cancer* 89, 2468-247.

Lantuejoul S, Soria JC, Morat L, Lorimier P, Moro-Sibilot D, Sabatier L, Brambilla C, Brambilla E. Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:2074-2082.

Lan Q, Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg RS, Dosemeci M, Rappaport SM, Shen M, Alter BP, Wu Y, Kopp W, Waidyanatha S, Rabkin C, Guo W, Chanock S, Hayes RB, Linet M, Kim S, Yin S, Rothman N, Smith MT. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science.* 2004 Dec 3;306(5702):1774-6.

Lauwerys R, Robert L, Vincent H, Perrine H, Dominique L. Toxicology industrielle et intoxications professionnelles. Masson 5 edition. 2007; Chapitre II: 528-539.

Lawrie CH, Saunders NJ, Soneji S, Palazzo S, Dunlop HM, Cooper

Liu J, Jia G. Methylation modifications in eukaryotic messenger RNA. *J Genet Genomics.* 2014 Jan 20;41(1):21-33.

Loft S, Høgh Danielsen P, Mikkelsen L, Risom L, Forchhammer L, Møller P. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair. *Biochem Soc Trans.* 2008 Oct;36(Pt 5):1071-6.

Lunec J, Holloway KA, Cooke MS, Faux S, Griffiths HR, Evans MD. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? *Free Radic Biol Med.* 2002 Oct 1;33(7):875-85.

Lv BH, Song SZ, Zhang Z, Mei Y, Ye FL. Urinary S-phenylmercapturic acid as a key biomarker for measuring occupational exposure to low concentrations of benzene in Chinese workers: a pilot study. *J Occup Environ Med.* 2014 Mar;56(3):319-25.

Le ND, Sun L., Zidek JV: Air pollution. *Chronic Dis Can.* 2010;29(Suppl 2):144-63.

Liu C, Yu J, Yu S, Lavker RM, Cai L, Liu W, Yang K, He X, Chen S. MicroRNA-21 acts as an oncomir through multiple targets in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2010 Jul;53(1):98-107.

Li H, Zhang W, Li W, Yin C. Effect of methylation of FHIT gene on its protein and mRNA expression in non-small cell lung cancer. 2009 12(7):760-4.

Malerba M, Montuschi P. Non-invasive biomarkers of lung inflammation in smoking subjects. *Curr Med Chem* 2012 19:187–96.

Manini P, De Palma G, Mutti A. 2007. Exposure assessment at the workplace: implications of biological variability. *Toxicol Lett* 168,210-218.

Manini P, De Palma G, Andreoli R, Mozzoni P, Poli D, Goldoni M, Petyx M, Apostoli P, Mutti A. Occupational exposure to low levels of benzene: Biomarkers of exposure and nucleic acid oxidation and their modulation by polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicol Lett.* 2010 Apr 1;193(3):229-35.

Manini P, De Palma G, Andreoli R, Marczynski B, Hanova M, Mozzoni P, Naccarati A, Vodickova L, Hlavac P, Mutti A, Vodicka P. Biomarkers of nucleic acid oxidation, polymorphism in, and expression of, hOGG1 gene in styrene-exposed workers. *Toxicol Lett.* 2009 Oct 8;190(1):41-7.

Manini P, De Palma G, Andreoli R, Poli D, Mozzoni P, Folesani G, Mutti A, Apostoli P. Environmental and biological monitoring of benzene exposure in a cohort of Italian taxi drivers. *Toxicol Lett.* 2006 Dec 1;167(2):142-51.

Manini P, De Palma G, Andreoli R, Poli D, Petyx M, Corradi M, Mutti A, Apostoli P. Biological monitoring of low benzene exposure in Italian traffic policemen. *Toxicol Lett.* 2008 Sep;181(1):25-30.

Mayer LP, NA Pearsall, PJ Christian, C. Payne, MK McCuskey, SL Mariong. 2002. Long term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol* 16: 775– 81.

Mutti, A.c., 2013. Linee guida per il Monitoraggio Biologico. Nuova Editrice Berti S.r.l, Piacenza, Italy.

Mutti A. Molecular diagnosis of lung cancer: an overview of recent developments. *Acta Biomed.* 2008;79 Suppl 1:11-23.

Mutti A, Corradi M. Recent developments in human biomonitoring: non-invasive assessment of target tissue dose and effects of pneumotoxic metals. *Med Lav.* 2006 Mar-Apr;97(2):199-206.

Mutti A, Corradi M, Goldoni M, Vettori MV, Bernard A, Apostoli P. Exhaled metallic elements and serum pneumoproteins in asymptomatic smokers and patients with COPD or asthma. *Chest.* 2006 May;129(5):1288-97.

Mutti A., Corradi M. *Lezioni di Medicina Del Lavoro.* Nuova editrice Berti. 2014; capitolo 17: 273-274.

Maniscalco M, De Laurentiis G, Pentella C, Mormile M, Sanduzzi A, Carratù P, Sofia M. Exhaled breath condensate as matrix for toluene detection: a preliminary study. *Biomarkers.* 2006 May-Jun;11(3):233-40.

Manser RL, Irving LB, Stone C, Byrnes G, Abramson M and Campbell D. Screening for lung cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004, CD001991.

Mentzer SJ, Swanson SJ, DeCamp M M, Bueno R, and Sugarbaker DJ. 1997. Mediastinoscopy, thoracoscopy, and video-assisted thoracic surgery in the diagnosis and staging of lung cancer. *Chest* 112, 239S-241S.

Miekisch W, Schubert JK, Noeldge-Schomburg GF. Diagnostic potential of breath analysis: focus on volatile organic compounds. *Clin Chim Acta* 2004; 347:25-39.

Miller AB, Altenburg HP, Bueno-de-Mesquita B, et al: Fruits and vegetables and lung cancer: Findings from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer* 2004,108:269-276.

Mountain CF. Revision in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997; 111:1710-1717.

Mountain CF. The international system for staging lung cancer. *Semin Surg Oncol.* 2000; 18:106-115.

Navasumrit P, Chanvaivit S, Intarasunanont P, Arayasiri M, Lauhareungpanya N, Parnlob V, Settachan D, Ruchirawat M. Environmental and occupational exposure to benzene in Thailand. *Chem Biol Interact.* 2005 May 30;153-154:75-83.

Navon R, Wang H, Steinfeld I, Tsalenko A, Ben-Dor A, Yakhini Z. Novel rank-based statistical methods reveal microRNAs with differential expression in multiple cancer types. *PLoS One.* 2009 Nov 25;4(11):e8003.

Nikitina EG, Urazova LN, Stegny VN. MicroRNAs and human cancer. *Exp Oncol.* 2012;34(1):2-8.

Nomiyama K, Nomiyama H. Respiratory retention, uptake and excretion of organic solvents in man. *Int Arch Arbeitsmed.* 1974; 32: 75-83.

NTP. 1991. 4-Vinylcyclohexene (VCH): Reproduction and Fertility Assessment in CD-1 Mice When Administered by Gavage in Corn Oil. NTIS Accession Nos. PB91211250 (Report) and PB1211268 (Lab. Suppl.).

O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Mycregulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*. 2005, 435:839-43.

Oh HK, Tan AL, Das K, Ooi CH, Deng NT, Tan IB, Beillard E, Lee J, Ramnarayanan K, Rha SY, Palanisamy N, Voorhoeve PM, Tan P. Genomic loss of miR-486 regulates tumor progression and the OLFM4 antiapoptotic factor in gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 May 1;17(9):2657-67.

Panani AD, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Letters* 2006; 239:1-9.

Patz EF. and Goodman P.C. Low-dose spiral computed tomography screening for lung cancer: not ready for prime time. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163, 813-814.

Patz EF. Integration of biomarkers and imaging. *J Thorac Oncol* 2006; 1:78-80.

Paustenbach D, Galbraith D. 2006. Biomonitoring and biomarkers: exposure assesement will never be the same. *Environ Health Perspect* 114, 1143-1149.

Peto R, Darby S, Deo H, Silcocks P, Whitley E, Doll R. Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ* 2000; 321:323-329.

Petty TL. 2000. The early identification of lung carcinoma by sputum cytology. *Cancer* 89, 2461-2464.

Pluda JM. Tumor associated angiogenesis: mechanism, clinical implications and therapeutic strategies. *Semin Oncol* 1997; 24:203.

Poli D, Vettori MV, Manini P, Andreoli R, Alinovi R, Ceccatelli S, Mutti A. A novel approach based on solid phase microextraction gas chromatography and mass spectrometry to the determination of highly reactive organic compounds in cells cultures: styrene oxide. *Chem Res Toxicol.*, 17(1):104-9, 2004.

Poli D, Carbognani P, Corradi M, Goldoni M, Acampa O, Balbi B, Bianchi L, Rusca M, Mutti A. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow up study. *Resp Res* 2005; 6:71.

Prieto L, Ferrer A, Palop J, Domenech J, Llusar R, Rojas R. Differences in exhaled breath condensate pH measurements between samples obtained with two commercial devices. *Respir Med.* 2007 Aug;101(8):1715-20.

Protano C, Andreoli R, Manini P, Vitali M. Urinary trans, trans-muconic acid and S-phenylmercapturic acid are indicative of exposure to urban benzene pollution during childhood. *Sci Total Environ.* 2012 Oct 1;435-436:115-23.

Rajapaksa KS, Cannady EA, Sipes IG, Hoyer PB. Involvement of CYP 2E1 enzyme in ovotoxicity caused by 4-vinylcyclohexene and its metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007 Jun 1;221(2):215-21.

Rossi A, Maione P, Colantuoni G. Screening for lung cancer: New horizons? *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56:311-20.

Rinsky RA, Smith AB, Hornung R, Filloon TG, Young RJ, Okun AH, Landrigan PJ. Benzene and leukemia. An epidemiologic risk assessment. *N Engl J Med.* 1987 Apr 23;316(17):1044-50.

Rysz J, Stolarek RA, Pedzik A, Fijalkowska J, Luczynska M, Sarniak A, Kasielski M, Makowka A, Nowicki M, Nowak D. Increased exhaled H₂O₂ and impaired lung function in patients undergoing bioincompatible hemodialysis. *Int J Artif Organs.* 2007 Oct;30(10):879-88.

Schettgen T, Tings A, Brodowsky C, Müller-Lux A, Musiol A, Kraus T. Simultaneous determination of the advanced glycation and product N (epsilon)-carboxymethyllysine and its precursor, lysine, in exhaled breath condensate using isotope-dilution-hydrophilic-interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2007 Apr;387(8):2783-91.

Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC: MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008, 299:425–436.

Schnatter AR, Glass DC, Tang G, Irons RD, Rushton L. Myelodysplastic syndrome and benzene exposure among petroleum workers: an international pooled analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Nov 21;104(22):1724-37.

Seike M, Kondo T, Fujii K, Okano T, Yamada T, Matsuno Y, Gemma A, Kudoh S, Hirohashi S. Proteomic signatures for histological types of lung cancer. *Proteomics* 2005; 5(11):2939-2948.

Seaton MJ, Schlosser PM, Bond JA, Medinsky MA. Benzene metabolism by human liver microsomes in relation to cytochrome P450 2E1 activity. *Carcinogenesis*. 1994 Sep;15(9):1799-806.

Shaffer K. Radiologic evaluation in lung cancer: diagnosis and staging. *Chest* 1997; 112,235S-238S.

Shaham D. Semi-invasive and invasive procedures for the diagnosis and staging of lung cancer. Percutaneous transthoracic needle biopsy. *Radiol Clin North Am* 2000; 38:525-534.

Shen J, Jiang F. Applications of MicroRNAs in the Diagnosis and Prognosis of Lung Cancer. *Expert Opin Med Diagn.* 2012 May;6(3):197-207.

Shen J, Todd NW, Zhang H, Yu L, Lingxiao X, Mei Y, Guarnera M, Liao J, Chou A, Lu CL, Jiang Z, Fang H, Katz RL, Jiang F. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Lab Invest.* 2011 Apr;91(4):579-87.

Shibata T, Uryu S, Kokubu A, Hosoda F, Ohki M, Sakiyama T, Matsuno Y, Tsuchiya R, Kanai Y, Kondo T, Imoto I, Inazawa J, Hirohashi S. Genetic classification of lung adenocarcinoma based on array-based comparative genomic hybridization analysis: its association with clinicopathologic features. *Clin Cancer Res* 2005; 11(17):6177-6185.

Si ML, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo YY. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene* 2007, 26: 2799–2803.

Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. 2009 Jun;6(3):267-83.

Singhal S, Vachani A, Antin-Ozerkis D, Kaiser LR, Albelda SM. Prognostic implications of cell cycle, apoptosis, and angiogenesis biomarkers in non-small cell lung cancer: a review. *Clin Cancer Res* 2005; 11:3974-3986.

Smith BJ, DE Carter, IG Sipes. 1990. Comparison of the disposition and in vitro metabolism of 4-vinylcyclohexene in the female mouse and rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 105 (3):364-71.

Smith, B. J., D. R. Mattison, and I. G. Sipes. 1991. Hepatic bioactivation of 4-vinylcyclohexene to ovotoxic epoxides. *Adv Exp Med Biol* 283:465-70.

Smith BJ, IG Sipes, JC Stevens, and J. R. Halpert. 1990. The biochemical basis for the species difference in hepatic microsomal 4-vinylcyclohexene epoxidation between female mice and rats. *Carcinogenesis* 11 (11):1951-7.

Smith BJ, Mattison DR, Sipes IG. 1990. The role of epoxidation in 4-vinylcyclohexene-induced ovarian toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 105: 372–381

Smith BJ, Sipes IG (1991) Epoxidation of 4-vinylcyclohexene by human hepatic microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol* 109: 367–371.

Soyer OU, Dizdar EA, Keskin O, Lilly C, Kalayci O. Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection. *Allergy*. 2006 Aug;61(8):1016-8.

Springer L N, JA Flaws, IG Sipes, PB Hoyer. 1996. Follicular mechanisms associated with 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. *Reprod Toxicol* 10 (2):137-43.

Springer LN, ME McAsey, JA Flaws, JL Tilly, IG Sipes, PB Hoyer. 1996. Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 139 (2):394-401.

Springer LN, JL Tilly, IG Sipes, PB Hoyer. 1996. Enhanced expression of bax in small preantral follicles during 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 139 (2):402-10.

Staessen JA, Nawrot T, Hond ED, Thijs L, Fagard R, Hoppenbrouwers K, Koppen G, Nelen V, Schoeters G, Vanderschueren D, Van Hecke E, Verschaeve L, Vlietinck R, Roels HA. Renal function, cytogenetic measurements, and sexual development in adolescents in relation to environmental pollutants: a feasibility study of biomarkers. *Lancet*. 2001 May 26;357(9269):1660-9.

Stark G. Functional consequences of oxidative membrane damage. *J Membr Biol* 2005. 205, 1-16.

Stein RA. Epigenetics and environmental exposures. *J Epidemiol Community Health*. 2012 Jan;66(1):8-13.

Strauss GM. The Mayo Lung Cohort: a regression analysis focusing on lung cancer incidence and mortality. *J Clin Oncol* 2002; 20, 1973-1983.

Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers - a different disease. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:778-790.

Swensen SJ, Jett JR, Hartman TE, Midthun DE, Mandrekar SJ, Hillman SL, Sykes AM, Aughenbaugh GL, Bungum AO, Allen KL. CT screening for Lung Cancer: five-years Prospective Experience. *Radiology* 2005; 235:259-265.

Talbot SG, Estilo C, Maghami E, Sarkaria IS, Pham DK, O-charoenrat P, Socci ND, Ngai I, Carlson D, Ghossein R, Viale A, Park BJ, Rusch VW, Singh B. Gene expression profiling allows distinction between primary and metastatic squamous cell carcinomas in the lung. *Cancer Res* 2005; 65(8):3063-3071.

Tamae K, Kawai K, Yamasaki S, Kawanami K, Ikeda M, Takahashi K, Miyamoto T, Kato N, Kasai H. Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Sci*. 2009 Apr;100(4):715-21.

Tomei F, Ghittori S, Imbriani M, Pavanello S, Carere A, Marcon F, Martini A, Baccolo TP, Tomao E, Zijno A, Crebelli R. Environmental and biological monitoring of traffic wardens from the city of Rome. *Occup Med (Lond)*. 2001 May;51(3):198-203.

Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, Konishi H, Morimura R, Deguchi K, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer*. 2010 Mar 30;102(7):1174-9.

Tzortzaki EG, Lambiri I, Vlachaki E, Siafakas NM. Biomarkers in COPD. *Curr Med Chem*. 2007;14(9):1037-48.

Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes Cj, Telser J, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 2004; 266:37-56.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J. (2006). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1):44-84.

Van Gestel CAM, Van Brummelen TC. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, 1996, 5(4), 217-225.

Vatrella A, Bocchino M, Perna F, Scarpa R, Galati D, Spina S, Pelaia G, Cazzola M, Sanduzzi A. 2007. Induced sputum as tool for early detection of airway inflammation in connective diseases-related lung involvement. *Respir Med* 101, 1383-1389.

Vansteenkiste J, Craps J, De Brucker N, Wauters I. Immunotherapy for non-small-cell lung cancer: the past 10 years. *Future Oncol*. 2015 May 20:1-15.

Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jul;2(7):489-501.

Wallace LA. Personal exposure to 25 volatile organic compounds. EPA's 1987 team study in Los Angeles, California. *Toxicol Ind Health*. 1991 Sep-Nov;7(5-6):203-8.

Wallace LA, Nelson WC, Ziegenfus R. The Los Angeles team study: Personal exposures, indoor-outdoor air concentrations, and breath concentrations of 25 volatile organic compounds. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* 1991; 1: 157-192.

Weng HH, Tsai SS, Chiu HF, Wu TN, Yang CY. Association of childhood leukemia with residential exposure to petrochemical air pollution in Taiwan. *Inhal Toxicol.* 2008 Jan;20(1):31-6.

Wilson SH, Suk WA (editors). *Biomarkers of environmentally associated disease.* Boca Raton: CRC Press, 2002.

Wong O.: Risk of acute myeloid leukemia and multiple myeloma in workers exposed to benzene. *Occup Environ Med* 1995; 52: 380 -384.

Xi L, Lyons-Weiler J, Coello MC, Huang X, Gooding WE, Luketich JD, Godfrey TE. Prediction of lymph node metastasis by analysis of gene expression profiles in primary lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11(11):4128-4135.

Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006 Mar;9(3):189-98.

Yesner R. *International Histological Classification of Tumors.* Geneva, WHO, (1982).

Zaman MS, Shahryari V, Deng G, Thamminana S, Saini S, Majid S, Chang I, Hirata H, Ueno K, Yamamura S, Singh K, Tanaka Y, Tabatabai ZL, Dahiya R. Up-regulation of microRNA-21 correlates with lower kidney cancer survival. *Epub* 2012 Feb 8.;7(2):e31060.

Zhao YR, Wang D, Liu Y, Shan L, Zhou JL. The PI3K/Akt, p38MAPK, and JAK2/STAT3 signaling pathways mediate the protection of SO against acute lung injury induced by limb ischemia/reperfusion in rats. *J Physiol Sci.* 2015 Nov 5.

Zhang D, Takigawa N, Ochi N, Tanimoto Y, Noujima D, Chen YY, Tanimoto M, Kiura K. Detection of the EGFR mutation in exhaled breath condensate from a heavy smoker with

squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2011 Sep;73(3):379-80. PubMed PMID: 21684624.

Zhang JX, Han YP, Bai C, Li Q. Notch1/3 and p53/p21 are a potential therapeutic target for APS-induced apoptosis in non-small cell lung carcinoma cell lines. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Aug 15; 8(8):12539-47.

Zhu S, Si ML, Wu H, Mo YY. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene Tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*., 2007, 282:14328-36.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare innanzitutto il Prof. Antonio Mutti per avermi concesso la possibilità di svolgere il mio lavoro di Dottorato presso il Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale e per i suoi preziosi insegnamenti e per la disponibilità costante dimostrata durante i tre anni.

Ringrazio il Prof. Massimo Corradi per la disponibilità e la fiducia riposta nel mio lavoro.

Ringrazio sentitamente il mio Tutor, il Prof. Matteo Goldoni, per la costante presenza, per i preziosi consigli che hanno accompagnato questo lungo percorso di Dottorato arricchendo la mia esperienza e fornendo ulteriori ambizioni di crescita.

Ringrazio la Dott.ssa Diana Poli per la fiducia e la stima manifestata nei miei riguardi, per essere stata costantemente disponibile, per aver sempre trovato il tempo di consigliarmi e indirizzarmi, per avermi fornito insegnamenti utili e preziosi durante tutto il percorso, per l'inestimabile tempo che ha dedicato a tutte le fasi di sviluppo del lavoro.

Ringrazio la Prof.ssa Roberta Andreoli, la Prof.ssa Paola Mozzoni, la Dott.ssa Rossella Alinovi e la Dott.ssa Silvana Pinelli per i numerosi insegnamenti forniti, arricchendo ulteriormente la mia crescita lavorativa, e per l'enorme contributo al mio lavoro di Dottorato.

Desidero ringraziare la Dott.ssa Sara Tagliaferri per aver condiviso con me numerosi momenti felici, per aver trovato sempre il tempo di ascoltarmi e consigliarmi nel migliore dei modi, per l'amicizia che mi ha dimostrato.

Infine, ringrazio la mia famiglia, i miei genitori, Vasil e Arta, mio fratello Marian, mia cugina Arlinda, per essermi stati sempre vicini, per avermi spronata e dato la forza a non mollare mai e a rialzarmi sempre più forte, e per altri innumerabili motivi. Ringrazio mia nonna Nokia sapendo come sarebbe stata fiera e felice per me e per le dolci parole che avrebbe detto. Senza di voi non sarei mai giunta a questo traguardo.