

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA



Dottorato di ricerca in
SCIENZE DELLA PREVENZIONE

Ciclo XXIV

**METODI PER LA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI
DELL'ESPOSIZIONE A POLVERI SOTTILI SUI MECCANISMI
EPIGENETICI DI REGOLAZIONE GENICA**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Antonio Mutti

Tutor:

Chiar.mo Prof. PierAlberto Bertazzi

Dottorando: Francesco Nordio

Ringraziamenti

Desidero innanzitutto ringraziare il coordinatore del Programma di Dottorato in SCIENZE DELLA PREVENZIONE, Prof. Antonio Mutti dell'Università degli Studi di Parma, per aver sempre dimostrato stima nei confronti del lavoro da me svolto, offrendo costante e disponibile collaborazione. Desidero ringraziare vivamente il Prof. PierAlberto Bertazzi per avermi dato la possibilità di lavorare sotto la sua attenta e preziosa direzione presso il dipartimento di Medicina del Lavoro dell'Università degli Studi di Milano. Desidero infine ringraziare il Prof. Andrea Baccarelli per i suoi consigli e correzioni, e per avermi dato la possibilità di portare a termine il mio percorso presso il suo laboratorio alla Medical School dell'Università di Harvard.

Introduzione.....	4
1. Background scientifico	8
1.1 La metilazione del DNA.....	8
1.2 Istoni.....	12
1.2.1 Il nucleosoma.....	13
1.2.2 Funzione degli istoni.....	14
1.2.3 Acetilazione degli istoni	14
1.2.4 Metilazione degli istoni	15
1.3 Telomeri	16
1.3.1 Natura e funzione dei telomeri.....	16
1.3.2 Accorciamento dei telomeri.....	18
1.3.3 Estensione dei telomeri e cancro.....	20
1.3.4 Tecniche utilizzate per l'analisi della metilazione del DNA.....	21
2. Descrizione dello studio scientifico	22
2.1 Principi del trattamento con sodio bisolfito e pyrosequencing	22
2.2 Obiettivo.....	27
2.3 Popolazione e quantificazione dell'esposizione	27
2.3.1 Prelievo Ematico.....	29
2.3.2 Informazioni raccolte per ogni lavoratore.....	30
2.3.3 Determinazione dell'esposizione individuale a polveri e metallica.....	32
2.4 Analisi Statistiche.....	35
2.4.1 Effetti a breve termine dell'esposizione a PM ₁₀ sulla metilazione del DNA.....	36
2.4.2 Effetti a lungo termine dell'esposizione a PM ₁₀ sulla metilazione del DNA.....	37
3. Risultati e Discussione.....	38
3.1 Progetto 1:	38
3.1.1 Discussione Progetto 1:	41
3.1.2 Conclusione Progetto 1:.....	45
3.2 Progetto 2:	46
3.2.1 Discussione Progetto 2:	48
3.2.2 Conclusione Progetto 2:.....	51
3.3 Progetto 3:	52
3.3.1 Discussione Progetto 3:	56
3.3.2 Conclusione Progetto 3:.....	59
3.4 Limiti dello Studio.....	60
Bibliografia	62

Introduzione

L'inquinamento dell'aria è associato a numerosi effetti nocivi sulla salute dell'uomo: molti studi epidemiologici condotti negli ultimi anni hanno mostrato come l'esposizione a polveri sottili, anche a basse concentrazioni, possa provocare effetti nocivi a breve e lungo termine e contribuire allo sviluppo di nuove patologie, così come all'aggravamento di condizioni patologiche preesistenti¹ quali asma, malattie respiratorie croniche, diabete, tumore del polmone e malattie cardiovascolari².

1. Negli ultimi anni, oltre agli effetti sulla salute di alcuni inquinanti primari (SO₂, NO, CO) e secondari (O₃, NO₂), la ricerca epidemiologica ha posto l'accento sull'azione tossica dei metalli e della frazione sottile e ultrasottile delle polveri ambientali (PM₁₀, PM_{2.5}), frequentemente presenti nelle aree metropolitane. Gli inquinanti dell'aria, infatti, sembrerebbero provocare effetti nocivi di tipo diretto a livello del sangue e dei tessuti, nonché modificazioni epigenetiche del DNA^{3 4 5 6}.

¹ Brunekreef B, Holgate ST, *Air pollution and health*; Lancet. 2002 Oct 19; 360(9341):1233-42.

² Bateson TF, Schwartz J, *Who is sensitive to the effects of particulate air pollution on mortality? A case-crossover analysis of effect modifiers*; Epidemiology, 2004 Mar;15(2):143-9.

³ Baccarelli A, Bollati V, *Epigenetics and environmental chemicals*; Curr Opin Pediatr. 2009 Apr;21(2):243-51.

⁴ Tarantini L, Bonzini M, Apostoli P, Pegoraro V, Bollati V, Marinelli B, Cantone L, Rizzo G, Hou L, Schwartz J, Bertazzi PA, Baccarelli A, *Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation*; Environ Health Perspect. 2009 Feb;117(2):217-22.

⁵ Yauk C, Polyzos A, Rowan-Carroll A, Somers CM, Godschalk RW, Van Schooten FJ, Berndt ML, Pogribny IP, Koturbash I, Williams A, Douglas GR, Kovalchuk O, *Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location*; Proc Natl Acad Sci USA. 2008 Jan 15;105(2):605-10.

⁶ 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.

2. L'epigenetica studia: le modificazioni ereditabili nella funzione del genoma che si verificano senza cambiamenti della sequenza di DNA⁷, ovvero lo studio dei fattori che possono provocare cambiamenti nell'espressione genica non associati ad alterazioni nella sequenza nucleotidica del DNA. Le più importanti modificazioni epigenetiche sono la metilazione del DNA e l'acetilazione degli istoni⁸.
3. La metilazione consiste nell'aggiunta di un gruppo metile (-CH₃) sul carbonio 5 della base azotata citosina all'interno del dinucleotide CpG. Le citosine metilate rappresentano il 2-5% di tutte le citosine presenti nel genoma dei mammiferi, e si ipotizza siano implicate nei processi di stabilità cromosomica. Nel genoma sono presenti delle zone definite "CpG Island" e formate da segmenti di DNA di 200 bp o più con un contenuto in G e C del 50%; queste zone sono per lo più rilevabili nelle vicinanze dell'estremità 5' dei geni, in molti casi a monte di un promotore, e il loro stato di metilazione partecipa al controllo dell'espressione genica. La principale conseguenza della metilazione del DNA è, infatti, l'alterazione del grado di compattezza della cromatina in cui, in condizioni normali, è organizzato il DNA. Una maggior compattezza della cromatina, dovuta alla presenza di promotori ipermetilati e con istoni deacetilati, esclude l'apparato trascrizionale della cellula e ne spegne l'espressione genica⁹. La metilazione delle CpG island inoltre è fondamentale nell'inattivazione del

⁷ Wolffe AP, Matzke MA, *Epigenetics: regulation through repression*; Science. 1999 Oct 15;286(5439):481-6.

⁸ Wrobel K, Wrobel K, Caruso JA, *Epigenetics: an important challenge for ICP-MS in metallomics studies*; Anal Bioanal Chem. 2009 Jan;393(2):481-6.

⁹ Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T, *The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation*; J Biol Chem. 2003 Feb 7;278(6):4035-40. Epub 2002 Nov 9.

cromosoma X, nel mantenimento della struttura cromatinica e nella determinazione dell'imprinting genomico. La metilazione delle citosine però è anche un importante fattore mutageno, dal momento che la deaminazione idrolitica che la 5-metil citosina può subire la trasforma in timina, generando un mismatch che non sempre viene correttamente riparato dai sistemi interni alla cellula¹⁰.

4. L'epigenetica contribuisce al normale differenziamento delle cellule dell'organismo, ma è anche implicata nello sviluppo di patologie come cancro, malattie cardiovascolari e molte condizioni ereditarie.
5. La metilazione del DNA e l'acetilazione degli istoni possono variare in relazione a differenti esposizioni ambientali, e l'alterazione del corretto *pattern* epigenetico potrebbe essere una possibile spiegazione del meccanismo di azione di alcuni agenti cancerogeni non genotossici. E' stato ad esempio ipotizzato che l'effetto cancerogenetico di alcuni metalli tossici che partecipano alla composizione del particolato dell'aria possa essere mediato dall'alterazione della metilazione globale o gene specifica.

È noto in letteratura che le modificazioni epigenetiche sono alla base della cancerogenesi indotta da nickel, ma anche altri metalli come arsenico, cromo e cadmio, contenuti in diverse concentrazioni nei prodotti alimentari e nell'acqua potabile, provocano cambiamenti nel pattern di metilazione globale e gene specifico: l'ipometilazione globale altera la stabilità dei cromosomi, mentre l'ipermetilazione gene specifica impedisce la corretta espressione del

¹⁰ Grewal SI, Moazed D, *Heterochromatin and epigenetic control of gene expression*; Science. 2003 Aug 8;301(5634):798-802.

gene stesso¹¹. I cambiamenti a livello epigenetico quindi, in particolare riguardanti la metilazione, sembrano avere un ruolo importante nello sviluppo di patologie di tipo tumorale¹² e studi su animali e in vitro lo confermano.

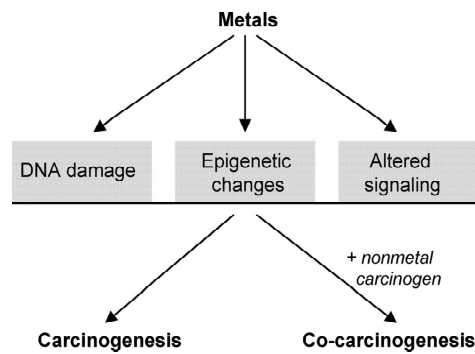


Figura 1: modello per la correlazione fra metalli e carcinogenesi.

La presentazione dell'attività svolta durante questi tre anni di attività si articola in tre sezioni. Nella prima sezione si riportano le nozioni di biologia molecolare necessarie per comprendere la natura degli *outcome* scelti per lo studio. Particolare attenzione è dedicata ai metodi di laboratorio utilizzati per la misura di questi *outcome*. Nella seconda sezione sono illustrati gli obiettivi del progetto di ricerca discutendone le potenzialità nell'acquisire conoscenze rilevanti, alla luce dei problemi emersi dalla revisione di letteratura. Nella terza e ultima parte si presentano le pubblicazioni scientifiche e i contributi a congressi effettuati nel corso del programma di dottorato. Tali pubblicazioni sono il risultato del mio coinvolgimento in diversi studi di epidemiologia ambientale e occupazionale e della mia collaborazione con il gruppo di ricerca del Dipartimento di Medicina del Lavoro, Università degli Studi di Milano.

¹¹ Salnikow K, Zhitkovich A, *Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and co carcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium*; Chem Res Toxicol. 2008 Jan;21(1):28-44.

¹² Kurkjian C, Kummar S, Murgu AJ, *DNA methylation: its role in cancer development and therapy*. Curr Probl Cancer. 2008 Sep-Oct;32(5):187-235.

1. Background scientifico

1.1 La metilazione del DNA

Uno dei meccanismi epigenetici maggiormente studiati è la metilazione del DNA: una modificazione covalente implicata in moltissimi processi biologici quali il silenziamento genico, l'inattivazione del cromosoma X sovrannumerario nelle donne, l'imprinting genomico e lo sviluppo embrionale. Nei mammiferi avviene a livello della base azotata citosina, dando origine alla 5' metil-citosina. Le 5-metilcitosine, rappresentano il 2-5% di tutte le citosine presenti nel genoma dei mammiferi e sono localizzate principalmente nei dinucleotidi CpG.

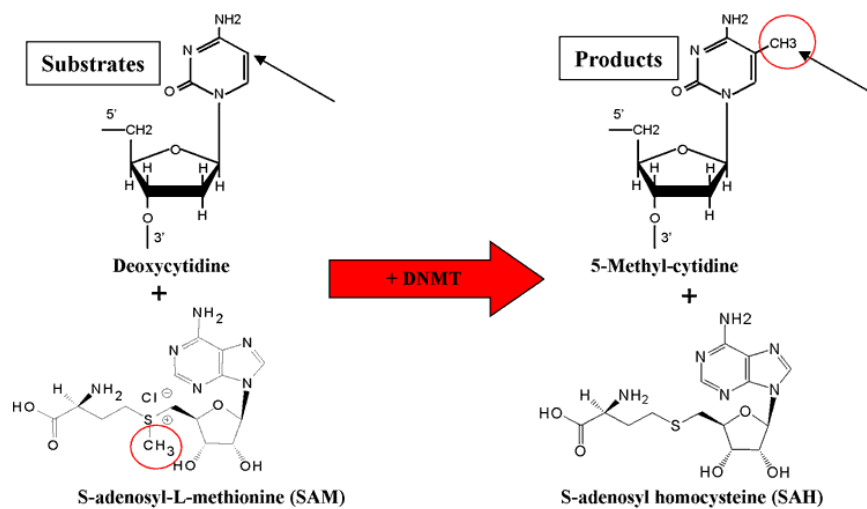


Figura 2: Metilazione del DNA.

La maggior parte dei CpG localizzati fuori dalle isole CpG è metilata; al contrario le Isole CpG, segmenti di DNA di 200 bp o più con un contenuto del 50% di G e C, sono solitamente non metilate e rilevabili soprattutto nelle vicinanze delle estremità 5' dei geni. Il ruolo delle citosine metilate non appartenenti alle isole CpG non è del tutto chiaro, ma

potrebbe riguardare la stabilità cromosomica. Le citosine localizzate in posizione 5' rispetto alle guanine, sono presenti nelle regioni regolatrici di molti geni, specialmente a livello dei promotori. La loro metilazione incide profondamente sull'espressione di diversi geni eucariotici: ad esempio, in alcune fasi del ciclo cellulare o in specifici tipi cellulari, le isole CpG vengono metilate, inducendo il silenziamento del gene adiacente alla sequenza. Solitamente lo stato di metilazione di un gene è inversamente correlato alla sua espressione genica: un progressivo stato di ipermetilazione causa l'inattivazione del gene interessato, mentre l'ipometilazione ne causa la riattivazione. La principale conseguenza della metilazione del DNA è, infatti, l'alterazione del grado di compattezza della cromatina in cui, in condizioni normali, è organizzato il DNA. Una maggior compattezza della cromatina, dovuta alla presenza di promotori genici ipermetilati e alla deacetilazione istonica, esclude l'apparato trascrizionale della cellula e ne spegne l'espressione genica.

Caratteristiche della cromatina	Cromatina trascrizionalmente attiva	Cromatina trascrizionalmente inattiva
Conformazione della cromatina	Conformazione aperta	Conformazione altamente condensate
Metilazione del DNA	Relativamente non metilata (nei promotori)	Metilata (anche nei promotori)
Acetilazione degli istoni	Istoni acetilati	Istoni deacetilati

Tabella 1: Caratteristiche della cromatina e suo ruolo nel processo di trascrizione.

Negli eucarioti la metilazione è catalizzata da una specifica famiglia di enzimi: le DNA-metiltransferasi (DNMTs). Queste sono responsabili del legame di un gruppo metile con il C5 della citosina che sarà tramutata in 5'-Metilcitosina. Nei mammiferi sono presenti tre classi diverse di DNA-metiltransferasi: DNMT1 è spesso chiamata metiltransferasi di mantenimento perché il suo ruolo è quello di conservare il corretto pattern di metilazione del DNA dopo la replicazione. DNMT3A e DNMT3B, invece, sono responsabili della metilazione de novo del DNA genomico dopo l'impianto dell'embrione.

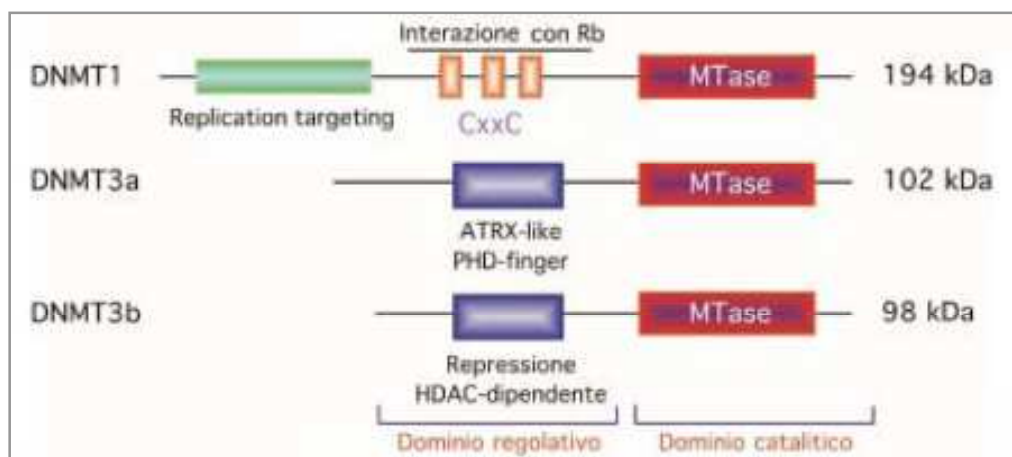


Figura 3: Struttura molecolare delle DNMT nei mammiferi.

Il pattern di metilazione è fondamentale deciso durante lo sviluppo. Durante la replicazione del DNA eucariotico, circa 40 milioni di dinucleotidi CpG sono convertiti in uno stato di semi-metilazione all'interno del filamento di DNA neo sintetizzato. DNMT1, che è localizzata sulla forca replicativa, metila in modo preciso il filamento neo sintetizzato (privo di metilazione) sullo stampo di quello semi-metilato, mantenendo così il pattern di metilazione originale. La metilazione del DNA, quindi, è uno dei meccanismi correlati con il differenziamento cellulare, tramite l'inibizione dell'espressione genica a livello

trascrizionale fin dai primi stadi di sviluppo embrionale. Qui durante la fase di segmentazione si assiste ad una prima demetilazione, seguita, dopo la fase di impianto dell'embrione, da una metilazione "de novo" del genoma ad opera delle DNMT3A e DNMT3B.

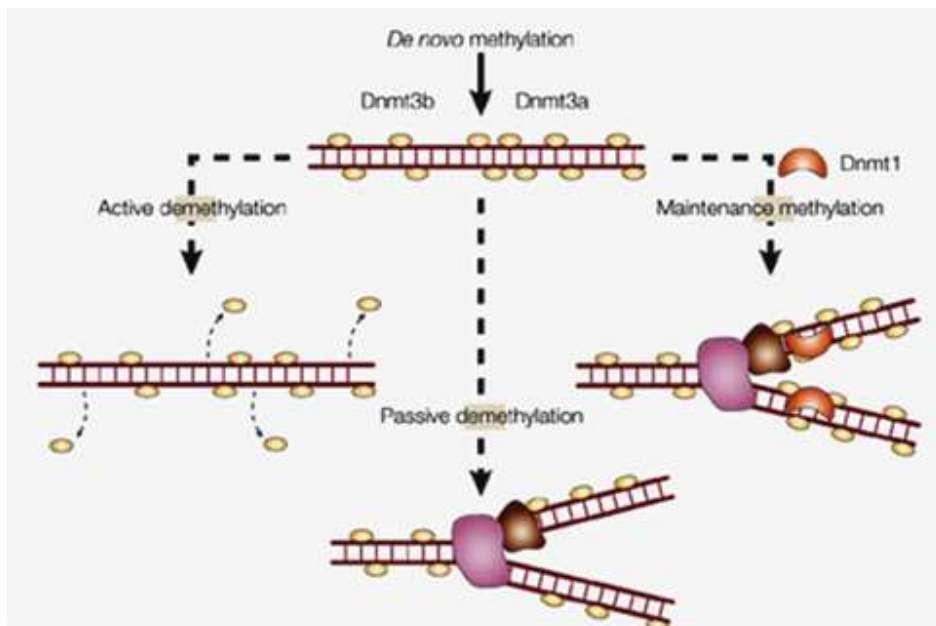


Figura 4: Fasi della metilazione del DNA durante lo sviluppo e ruolo degli enzimi DNMT.

In particolare, DNMT3A è responsabile della metilazione de novo nei primissimi stadi dello sviluppo delle cellule germinali prenatali, mentre DNMT3B è coinvolta nel mantenimento di questa metilazione de novo nei primi stadi della mitosi di queste cellule germinali. Mutazioni a livello del gene della DNMT3B sono associate a disordini da immunodeficienza o instabilità dei centromeri. Nel corso dell'evoluzione il numero di CpG nel DNA dei vertebrati è andato via via diminuendo. Fanno eccezione le sequenze chiamate CpG in cui la frequenza CG è quella attesa, che rappresentano le regioni trascrizionalmente attive.

1.2 Istoni

Gli istoni sono le proteine più abbondanti associate ai cromosomi¹³. Sono una delle famiglie di proteine maggiormente conservate dal punto di vista evolutivo. Sono proteine basiche cariche positivamente, poiché posseggono un gran numero di amminoacidi con catena laterale basica, in particolare lisina e arginina. Gli istoni interagiscono con il DNA, che è carico negativamente a causa dell'abbondanza di gruppi fosfato, per formare strutture dette nucleosomi. Esistono cinque tipi di istoni comuni: H1, H2a, H2b, H3, H4.

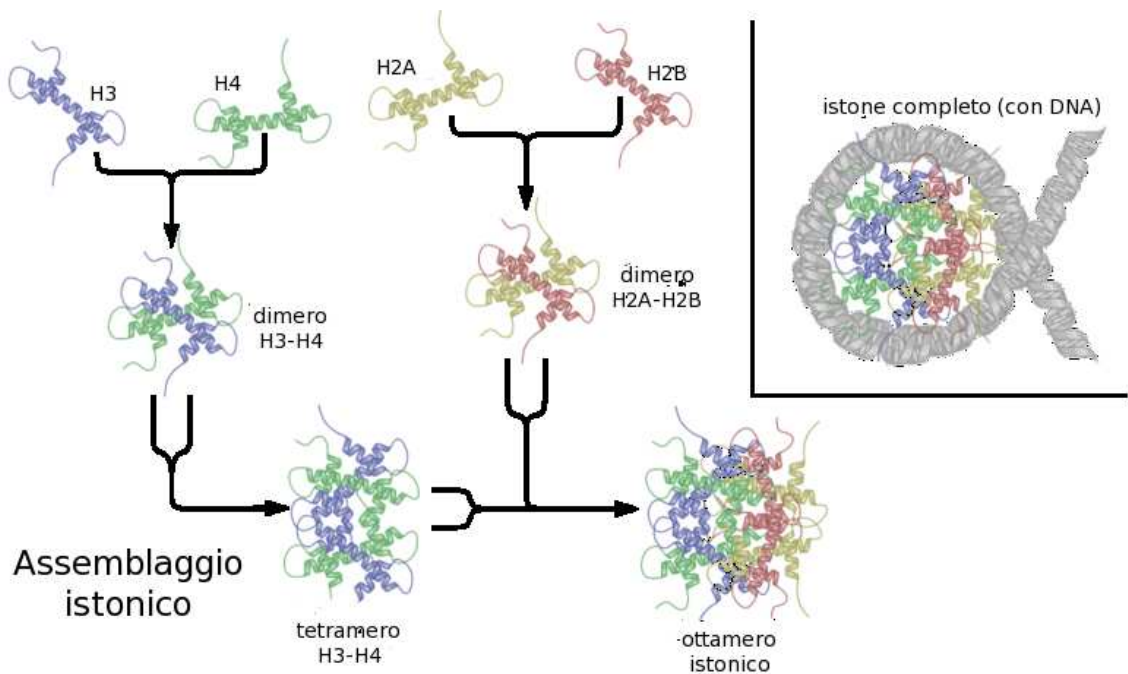


Figura 5: L'assemblaggio degli istoni a formare il nucleosoma.

Essi hanno in comune una struttura detta dominio histone-fold composta da 3 alfa eliche separate da 2 loop non strutturati. Gli istoni H2A, H2B, H3, H4 si autoaggregano, formando un ottamero chiamato ottamero istonico, intorno al quale il DNA si avvolge in modo

¹³ Bruce Alberts; Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Capitolo 4: DNA, cromosomi e genomi in Biologia molecolare della cellula*, 5a ed., Bologna, Zanichelli [novembre 1984], marzo 2009. ISBN 978-88-08-20185-0

sinistrorso per 1,65 giri, interagendo con gli istoni mediante interazioni non covalenti (es. legame a idrogeno). Il complesso formato da DNA più ottamero istonico è detto nucleosoma. 1,65 giri di elica sinistrorsa corrispondono a circa 200bp, di cui 150bp sono strettamente legate all'ottamero istonico mentre le restanti 50bp, distribuite in due pezzi da 25bp, si trovano legate ad H1, l'istone linker (queste 50bp sono dette DNA linker poiché permettono il legame tra due nucleosomi adiacenti).

1.2.1 Il nucleosoma

Il processo di formazione del nucleosoma è di tipo autoaggregativo e si verifica solo se è presente anche il DNA; in caso contrario le proteine istoniche non si aggregano. Il processo di formazione del nucleosoma prevede i seguenti passaggi:

- 1) Formazione di un tetramero composto da H3 e H4 (due per ciascuno).
- 2) Il tetramero lega nel solco minore una zona ricca di AT del genoma eucariotico e lo ripiega.
- 3) Si forma un dimero H2A-H2B che lega il DNA e il tetramero precedente.
- 4) H1 riconosce il DNA linker e ne causa l'avvicinamento all'ottamero istonico. Il nucleosoma è completo.

1.2.2 Funzione degli istoni

Il ruolo fondamentale degli istoni è quello di organizzare il DNA, compattandolo in maniera ordinata, in modo tale da consentire alle cellule di conservarlo in un volume ristretto come quello del nucleo. Nell'uomo il fattore di compattazione del genoma è pari a quasi 10000 volte poiché quasi 2m di genoma umano sono impacchettati in un nucleo di circa 2 μm (10^{-6}m). Gli istoni, e quindi i nucleosomi, non vanno pensati come entità completamente passive con funzioni puramente strutturali, ma come strutture dinamiche soggette ad un gran numero di modificazioni post-traduzionali. Oggi è ormai evidente l'esistenza di un vero e proprio codice istonico in grado di regolare l'espressione genica. Ciascun istone dell'ottamero presenta una lunga coda N-terminale che si estende al di fuori del nucleosoma: queste code possono subire numerose modificazioni promosse da specifici enzimi che originano acetilazione, metilazione, ubiquitinazione, fosforilazione. Tali modificazioni influiscono sulla struttura della cromatina facilitando la trascrizione di un gene, la sua inibizione o altri importanti meccanismi. Esistono ormai molte prove che mostrano come molti attivatori della trascrizione posseggano attività istone-acetilasica; viceversa, molti repressori paiono possedere attività istone-deacetilasica.

1.2.3 Acetilazione degli istoni

Questo tipo di modificazione è alla base dell'espressione genica. Essa è promossa da una classe di enzimi chiamate HATs (Histone Acetyltransferases) e prevede il trasferimento di un gruppo acetile (il donatore è l'acetil-coenzima A) su un residuo amminoacidico di lisina presente all'estremità N-terminale di tutti gli istoni che formano il nucleosoma. La lisina perde così la carica positiva normalmente presente a pH cellulare sull'azoto della catena laterale e di conseguenza non è più in grado di legare con alta affinità i gruppi fosfato del

DNA (che ha carica negativa). In realtà, non sono enzimi altamente specifici, possono infatti modificare più di un residuo amminoacidico. Il DNA viene quindi rilassato in quel punto permettendo ad altre proteine o enzimi di interagire con esso. Le principali HATs sono una cosiddetta p300 ed il suo omologo proteina legante CREB (CREB-binding protein o CBP). Sono rappresentate in modo ubiquitario e acetilano gli istoni dopo stimoli cellulari molto vari. La loro attività è particolarmente alta nelle cellule nervose, in quelle del midollo osseo ed in alcune strutture endocrine, cioè in quelle linee cellulari in attiva replicazione o elevato metabolismo. Tra queste ovviamente bisogna includere le cellule tumorali. Le HATs sono diventate, recentemente, un potenziale bersaglio della terapia contro i tumori. Sono ormai una decina, infatti, i composti che hanno mostrato attività inibitoria verso questa classe di enzimi. Strutturalmente essi appartengono ai derivati alchilici della 6-idrossi-chinolina ed ai sostituiti aromatici dell'isotiazolo. Le prove in vitro hanno dato risultati incoraggianti sulla loro efficacia, ma non sono ancora entrati in alcuna sperimentazione pre-clinica. Molti coattivatori trascrizionali, sembrano possedere un'attività di acetilazione istonica intrinseca. Inoltre le HATs intervengono nel processo di attivazione della trascrizione.

1.2.4 Metilazione degli istoni

La metilazione degli istoni è una reazione mediata dalla classe di enzimi istone metiltrasferasi (HMTs; Histone Metiltransferases) e prevede il trasferimento di un gruppo metilico ad una lisina o un'arginina presente all'estremità N-terminale degli istoni H3 o H4. Il donatore dei gruppi metilici è la S-adenosil-metionina (o SAM). Gli effetti possono essere differenti. Un esempio è dato dalla metilazione di H3K9 (legge: Lisina 9 sull'istone H3) che porta porta alla formazione di un sito di legame per la proteina principale dell'eterocromatina (heterochromatin protein-1 o HP1), una proteina in grado di indurre

impacchettamento e quindi il silenziamento. Viceversa una metilazione di H3K4 ha l'effetto opposto e promuove l'apertura cromatinica con conseguente aumento dell'espressione genica. Sfruttando questa capacità, alcuni ricercatori hanno messo a punto dei composti chimici in grado di competere con le funzioni cellulari di alcune HMTs. Si tratta di derivati policiclici dell'indolo e della chinazolina e sono impiegati in laboratorio per delucidare i meccanismi di regolazione genica guidata dai processi di metilazione.

1.3 Telomeri

Il telomero è la regione terminale del cromosoma, da cui deriva il nome stesso, composta di DNA altamente ripetuto, che non codifica per alcun prodotto proteico. Ha un ruolo determinante nell'evitare la perdita di informazioni durante la duplicazione dei cromosomi¹⁴. La DNA polimerasi, infatti, non è in grado di replicare il cromosoma fino alla sua terminazione; se non ci fossero i telomeri, che quindi vengono accorciati ad ogni replicazione, la replicazione del DNA comporterebbe in ogni occasione una significativa perdita di informazione genetica. Vi sono prove che questo progressivo accorciamento dei telomeri sia associato all'invecchiamento della cellula e dell'intero organismo.

1.3.1 Natura e funzione dei telomeri

Il telomero è composto da sequenze ripetute di DNA e da alcune proteine ed ha la funzione di proteggere le terminazioni dei cromosomi. Ciò impedisce da una parte la degradazione progressiva con rischio di perdita di informazione, dall'altra che tale regione, non presentando una corretta struttura a doppia elica, sia processata come estremità di filamento spezzato, con il rischio di fusione tra due regioni telomeriche di cromosomi diversi. I

¹⁴ Cong YS, Wright WE, Shay JW, *Human telomerase and its regulation*; Microbiol Mol Biol Rev. 2002 Sep;66(3):407-25, table of contents.

telomeri sono estesi dall'enzima telomerasi (hTERT, *Human Telomerase Reverse Transcriptase*), che rappresenta una classe di retrotrascrittasi specializzate, presenti in numerosi organismi (tra cui l'uomo), ma non in tutti (e soprattutto non in tutte le fasi dello sviluppo). In particolare, nell'uomo le telomerasi (così come nella maggior parte degli eucarioti multicellulari) sono attive solo nelle cellule della linea germinale: ciò significa che, ad ogni replicazione, i telomeri umani si accorciano di un certo numero di paia di basi. Esistono teorie che associano il continuo accorciarsi dei telomeri con la senescenza delle cellule della linea somatica e con la prevenzione del cancro. Questo perché i telomeri agirebbero come una sorta di orologio biologico, legato cioè ad un numero massimo di mitosi (e di replicazioni del DNA), al termine del quale la cellula sarebbe troppo vecchia per essere mantenuta in vita e prenderebbe la via dell'apoptosi. Per garantire un efficace ricambio cellulare, in ogni caso, in molti tessuti dell'organismo sono presenti cellule staminali, che mantengono la corretta lunghezza dei telomeri attraverso meccanismi diversi, poiché come si è detto, le telomerasi sono espresse solo nella linea germinale. È stata sviluppata per le staminali una teoria, la teoria del filamento immortale, secondo la quale, essa, tramite una anafase non casuale, conserva i due filamenti originali per se, lasciando i filamenti accorciati per la cellula figlia non staminale. Il meccanismo molecolare attraverso cui i telomeri troppo corti possono portare alla morte cellulare sembra essere legato alla perdita del loro corretto ripiegamento naturale (evento legato ad una loro dimensione troppo ristretta). Secondo alcune teorie comunemente accettate, la cellula è infatti in grado di riconoscere questo diverso ripiegamento come danno al DNA, avviando il *pathway* dell'apoptosi sulla base dell'attività di molecole come p53. Tale processo di morte cellulare può anche essere avviato da una fusione tra cromosomi. Nell'uomo, la sequenza ripetuta nei

telomeri è composta di sei nucleotidi TTAGGG, ripetuti per una lunghezza che va da 3 a 20 kilobasi. Sono presenti 100-300 kilobasi addizionali di ripetizioni telomero-associate, che si dispongono tra il telomero ed il resto del cromosoma. La sequenza telomerica varia da specie a specie (si veda il paragrafo sulle sequenze telomeriche), ma generalmente è ricca in GC. Nella maggior parte dei procarioti, i cromosomi sono circolari: ciò significa che non presentano alcun tipo di telomero.

1.3.2 Accorciamento dei telomeri

I telomeri si accorciano a causa del meccanismo di replicazione del filamento lagging del DNA. Dal momento che la replicazione del DNA non ha inizio dalle estremità ma da varie regioni più centrali di ogni cromosoma e che tutte le DNA polimerasi polimerizzano in direzione 5' → 3' (spostandosi in direzione 3' → 5'), infatti, il DNA in replicazione presenta un filamento *leading* ed uno *lagging*. Sul filamento *leading*, la DNA polimerasi può produrre un filamento complementare senza ostacoli, perché procede da 5' a 3'. Al contrario, c'è un problema riguardo al senso 3' → 5' che l'enzima dovrebbe prendere sul lagging. Per risolvere questo problema, piccole sequenze di RNA (RNA primer) legano tale filamento e agiscono come innesco, favorendo l'attacco della DNA polimerasi e l'avvio della polimerizzazione. Questo processo genera la formazione dei frammenti di Okazaki. I frammenti di Okazaki sono processati infine dalla DNA polimerasi, che sostituisce l'RNA dei primers con DNA, e dalla DNA ligasi, che forma il legame fosfodiesterico tra frammenti consecutivi.

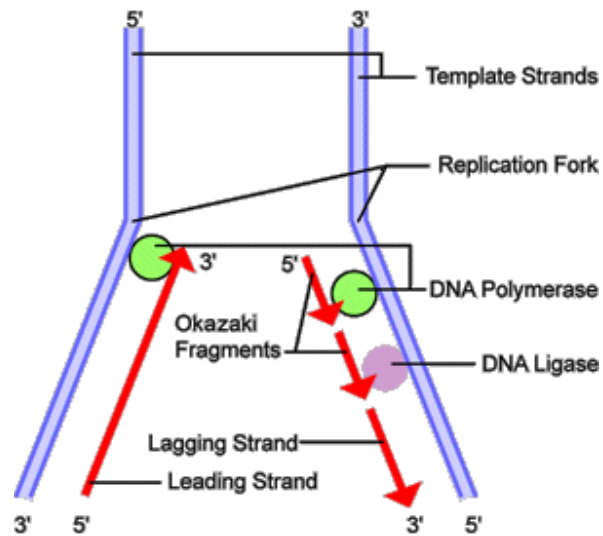


Figura 6: Il filamento *lagging* durante la replicazione del DNA.

Questo accade presso tutti i siti del filamento *lagging*, ma non dove si appaia l'ultimo primer di RNA. In questa regione, infatti, l'RNA viene distrutto da RNA si, ma non c'è alcuna sostituzione con DNA. Questo genera un continuo processo di accorciamento di queste regioni, che si trovano appunto presso i telomeri.

1.3.3 Estensione dei telomeri e cancro

La presenza di un limite al numero di divisioni cellulari, dovuto all'accorciamento dei telomeri, fu individuato per la prima volta da Leonard Hayflick. Tali osservazioni lo portarono ad ipotizzare un ben preciso numero massimo di mitosi, che fu appunto definito limite di Hayflick. La correlazione tra senescenza e numero di Hayflick, in ogni caso, fu provata solo nel 1998, quando la Geron Corporation mise a punto tecniche in grado di estendere i telomeri, che comportavano un notevole rallentamento della senescenza delle cellule. Numerosi sostenitori delle tecnologie per l'allungamento della durata della vita, infatti, hanno da tempo focalizzato la loro attenzione sul ruolo dei telomeri e sulle possibilità di allungarli. Ciò sarebbe in linea di principio possibile attraverso l'induzione delle telomerasi temporaneamente (per via farmacologica) o permanentemente (attraverso la terapia genica). Tali approcci, in ogni caso, non sono stati confermati da studi indipendenti sull'uomo, sebbene nel 2006 la Geron Corporation abbia annunciato lo sviluppo di due possibili farmaci in grado di attivare la telomerasi¹⁵. Nel 2003 i ricercatori hanno individuato per la prima volta un organismo i cui telomeri si estendono in maniera via via maggiore con l'invecchiamento dell'organismo. Le principali perplessità della comunità scientifica riguardo a questo tipo di approccio, comunque, riguardano l'eventuale rischio cancerogeno che tali farmaci potrebbero comportare: l'allungamento della vita di ogni cellula, infatti, è intrinsecamente correlato ad un aumento della vulnerabilità al cancro. D'altra parte, il mantenimento della lunghezza dei telomeri è un segno distintivo di molti tipi di cancro nei mammiferi. Nell'uomo, ad esempio, numerosi tumori sono in grado di aumentare l'attività della telomerasi, ottenendo una capacità di replicazione pressoché infinita. Altri tipi di

¹⁵ <http://www.geron.com/>

carcinoma, invece, sono in grado di avviare *pathway* alternativi di allungamento dei telomeri (noti come ALT, dall'inglese *alternative lengthening of telomeres*), che coinvolgono il trasferimento di ripetizioni telomeriche in tandem tra cromatidi fratelli. Il meccanismo di attivazione di ALT, in ogni caso, non è ancora molto ben definito. Tecniche sicure di estensione dei telomeri, in ogni caso, sono e saranno utili soprattutto nel campo dell'ingegneria tissutale, dal momento che permetterebbero di produrre grandi quantità di cellule sane e non cancerogene da utilizzare per sostituzioni di tessuti danneggiati (ad esempio tessuto cutaneo in seguito ad ustioni).

1.3.4 Tecniche utilizzate per l'analisi della metilazione del DNA

Lo studio della metilazione del DNA può essere effettuato con diverse metodiche. La maggior parte di questi metodi utilizza la conversione con sodio bisolfito; una reazione chimica che causa la deaminazione delle citosine, ma non quella delle metil-citosine. In seguito alla conversione e al cambio di sequenza, è possibile analizzare la percentuale di metilazione attraverso sequenziamento diretto, digestione con enzimi di restrizione specifici (COBRA), MS-SnuPE, PCR con primer specifici (MSP) o Pyrosequencing. Nonostante la varietà di metodi disponibili, il pyrosequencing è l'unico che permetta una quantificazione accurata di ogni singola citosina e una variabilità tra i diversi run molto bassa, requisito indispensabile per lo studio di tessuti sani esposti ad inquinanti ambientali. Il pyrosequencing è una tecnica di sequenziamento del DNA che si basa sulla rilevazione dei pirofosfati rilasciati durante la sintesi del DNA. Attraverso una cascata di reazioni enzimatiche, si otterrà la produzione di luce visibile proporzionale al numero dei nucleotidi incorporati, in base della sequenza del template.

2. Descrizione dello studio scientifico

2.1 Principi del trattamento con sodio bisolfito e pyrosequencing

L'analisi della metilazione richiede l'amplificazione del DNA mediante PCR. Utilizzando come template il DNA estratto dal buffy coat dei nostri soggetti si perderebbe però la differenza tra citosine metilate e non metilate. Per ovviare a questo inconveniente viene utilizzato un trattamento iniziale con sodio bisolfito. Il metodo, messo a punto nel 1970 si basa sulle proprietà chimiche del sodio bisolfito, che è in grado di legarsi al doppio legame 5-6 di tutte le citosine non metilate appartenenti ad una qualsiasi sequenza di DNA, ma non riesce ad interagire con le citosine metilate.

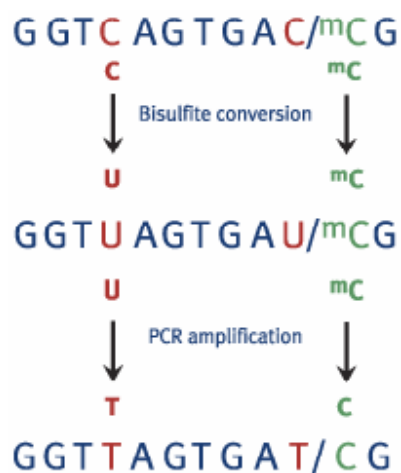


Figura 7: Trattamento con bisolfito

L'aggiunta di bisolfito rende la citosina non metilata suscettibile alla deaminazione idrolitica. Infine, le citosine deaminate saranno convertite in uracili in presenza di un pH alcalino, eliminando poi i residui di bisolfito. Gli uracili si replicano in PCR come timine, così da poter essere evidenziati come normali mutazioni. In realtà, anche le 5-Metilcitosine

legano le timine in presenza di sodio bisolfito, ma in tempi molto più lunghi. Questa differenza di comportamento mi permetterà di discriminare all'interno della reazione di PCR le citosine dalle metil-citosine. Il DNA trattato con bisolfito verrà poi sottoposto a PCR. Gli elementi ripetuti sono così amplificati attraverso l'utilizzo di un primer marcato con biotina. Questo accorgimento permette la successiva separazione del prodotto finale su biglie di sefarosio. I prodotti di PCR biotinilati possono essere purificati e denaturati a singolo filamento, per essere usati come template nella successiva reazione di pyrosequencing.

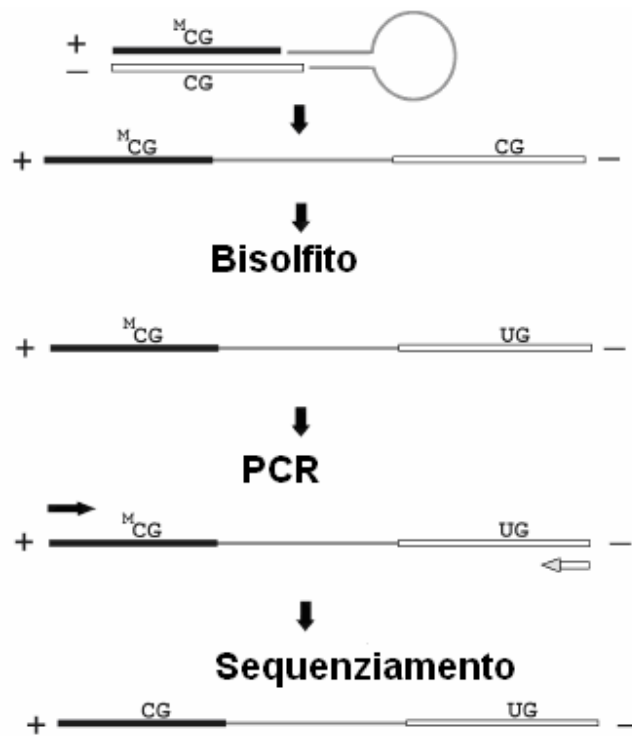


Figura 8: Tappe per l'analisi della metilazione del DNA

Il pyrosequencing, al contrario dell'elettroforesi più tradizionale, permette un sequenziamento diretto con metodo di sintesi, eliminando gli artefatti dovuti alla struttura secondaria del DNA. Con questo metodo è possibile analizzare contemporaneamente molti siti di metilazione e, al contrario di metodi alternativi basati sulla digestione del DNA con

enzimi di restrizione capaci di distinguere tra 5mC e C non metilate (trasformate in U dal bisolfito), non è necessario individuare i siti di restrizione interni al sito di metilazione. Inoltre, tramite l'utilizzo del pyrosequencing si evita il sequenziamento di cloni multipli e si ottiene una quantificazione accurata dei siti di metilazione, dato che è possibile l'analisi di più siti all'interno di uno stesso run. La tecnica del pyrosequencing è una tecnica ad elevata sensibilità (più dello 0,01% degli alleli metilati presenti vengono rilevati, basso coefficiente di variazione in esperimenti, miglior rapporto segnale/rumore di fondo) che permette un'analisi qualitativa e quantitativa della metilazione del DNA.

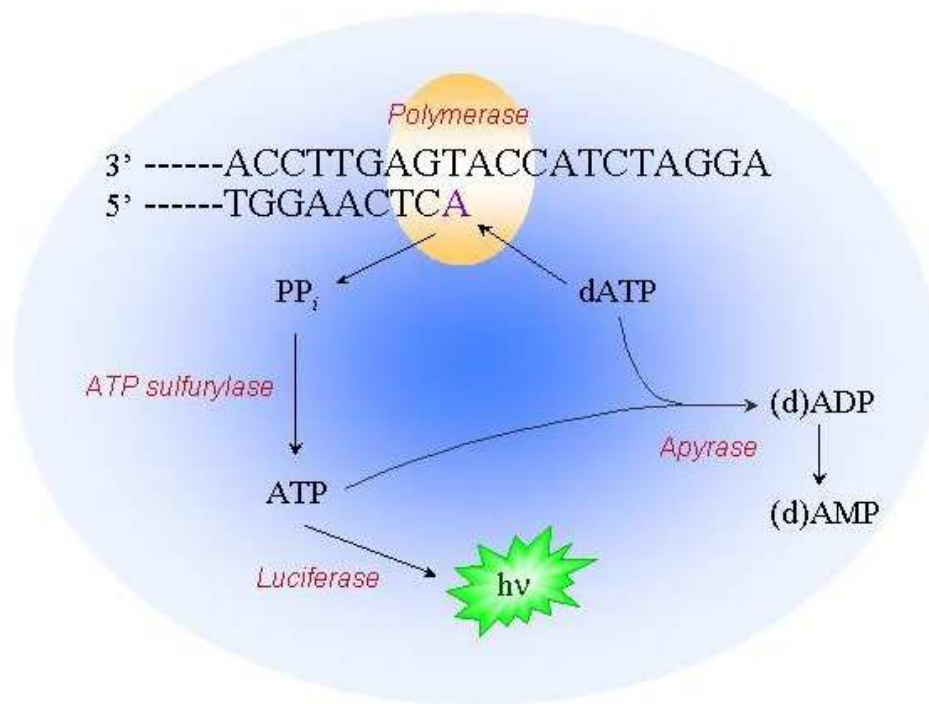
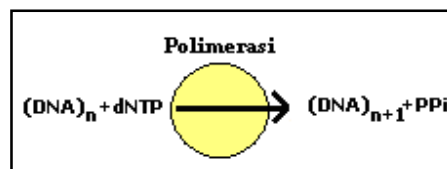


Figura 9: Pyrosequencing: reazioni enzimatiche

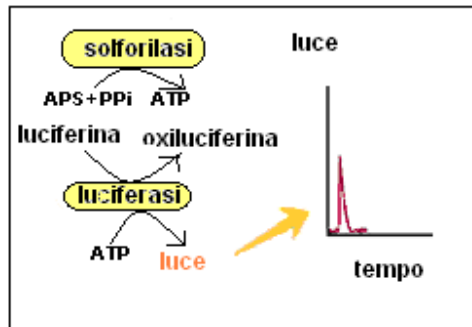
Si tratta di un sequenziamento diretto con metodo di sintesi in cui i nucleotidi vengono aggiunti uno per volta, e grazie agli enzimi presenti nella reazione, si produce un segnale luminoso proporzionale al numero di nucleotidi incorporati. Il segnale è rilevato da una CCD camera e, man mano che la sintesi procede, la sequenza che si crea viene elaborata come picchi dal software di lettura. La metodica del pyrosequencing prevede, come primo passaggio, l'ibridazione del primer di sequenziamento con il template di DNA a singolo filamento, l'aggiunta del primo nucleotide e l'incubazione coi diversi enzimi e substrati.

In particolare risultano necessari alla reazione:

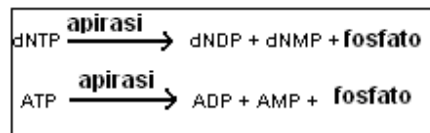
- ✓ DNA polimerasi: responsabile dell'incorporazione del desossiribonucleotide trifosfato (dNTP) solo nel caso in cui questo sia complementare alla base del template. Per ogni evento di incorporazione si avrà il rilascio di pirofosfato (PPi) in misura equimolare alla quantità di nucleotide incorporato.



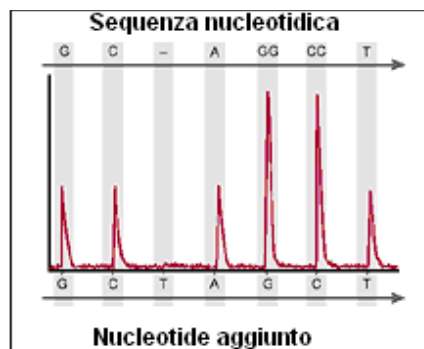
- ✓ ATP fosforilasi: converte in modo quantitativo il PPi in ATP in presenza di adenosina-5' fosfato.
- ✓ Luciferasi: converte la luciferina in oxiluciferina utilizzando ATP e generando luce visibile in misura proporzionale alla quantità di ATP impiegata. Questo significa che il segnale luminoso risulta proporzionale al numero di nucleotidi incorporati.
- ✓ La luce sarà quindi rilevata attraverso una camera CCD e visibile come picco in un grafico.



- ✓ Apirasi: degrada continuamente i nucleotidi non incorporati e l'ATP in eccesso. Quando la reazione di degradazione è completa sarà aggiunto un altro nucleotide.



- ✓ I nucleotidi sono aggiunti alla reazione uno alla volta fino a completare la formazione di una sequenza di DNA complementare al template. Infine, per la determinazione di tale sequenza si utilizzano programmi informatici che fanno uso di pyrogrammi nei quali ogni base incorporata verrà visualizzata come un picco nel grafico.



2.2 Obiettivo

L'obiettivo del progetto è di valutare gli effetti dell'esposizione occupazionale a polveri sottili (PM) e di identificare i meccanismi biologici che mediano e determinano il rischio di patologie associate all'inalazione di PM. E' nostra intenzione valutare se l'esposizione professionale ad alte concentrazioni di PM provochi alterazioni a livello epigenetico. Sembra esistere, infatti, una correlazione tra l'esposizione ambientale a polveri sottili e l'insorgenza di possibili alterazioni nei meccanismi di regolazione dell'espressione genica, meccanismi di silenziamento genico che avvengono senza modificazioni della sequenza del DNA. I principali meccanismi epigenetici sono: la metilazione del DNA, le modificazioni a livello istonico. E' noto che tali alterazioni epigenetiche svolgono un ruolo importante nella insorgenza di patologie acute e croniche. L'identificazione di tali alterazioni associate all'esposizione, dimostrerebbe la presenza di effetti biologici precoci potenzialmente correlati al rischio di sviluppare malattie.

2.3 Popolazione e quantificazione dell'esposizione

I soggetti allo studio sono costituiti da 63 lavoratori di sesso maschile, di età compresa tra 25-55 anni assunti da almeno un anno presso un'industria siderurgica in provincia di Brescia. I lavoratori erano così suddivisi:

- ✓ 20 lavoratori a turni impiegati in acciaieria nel reparto forno e colata (il reparto ove avviene la vera e propria fusione dei rottami e la colata in continuo dell'acciaio fuso, caratterizzato dai più alti livelli di stress termico e di polverosità);
- ✓ 17 lavoratori a turni impiegati nel reparto detto "laminatoio" (dopo il reparto forno dove avviene il progressivo raffreddamento e taglio dell'acciaio fuso fino alla realizzazione del prodotto finito: barre di acciaio dette bindelle);

- ✓ 26 lavoratori giornalieri addetti alla manutenzione degli impianti (caratterizzati da mansioni più variabili nel tempo in quanto lavorano in entrambi i reparti per la manutenzione ordinaria del ciclo produttivo).

I lavoratori detti a turno (primi due gruppi citati) svolgono la loro attività con una rotazione che prevede quattro giorni lavorativi di 8 ore ciascuno, seguiti da due giorni di riposo. I manutentori invece svolgono la loro attività per otto ore al giorno, senza rotazione ma con una settimana lavorativa dal Lunedì al Venerdì. La partecipazione allo studio di ogni soggetto ha previsto:

- ✓ informazione su scopi e modalità dello studio.
- ✓ firma di consenso informato.
- ✓ prelievo di sangue venoso a inizio e fine del turno settimanale.
- ✓ somministrazione di due brevi questionari (uno auto compilato e l'altro compilato al momento del prelievo).
- ✓ misurazione dell'esposizione.

2.3.1 Prelievo Ematico

Tutti i soggetti sono stati sottoposti ad un prelievo venoso a distanza di 4 giorni. Nello specifico, il primo prelievo è stato effettuato il giorno di inizio del turno settimanale di lavoro (baseline) e il secondo l'ultimo giorno del turno settimanale (post-esposizione). Per ciascun soggetto sono stati raccolti circa 40 ml di sangue venoso in diverse provette:

- ✓ n°1 provetta citrato da 4,5 ml.
- ✓ n°1 provetta EDTA da 7 ml.
- ✓ n°3 provette citrato da 6 ml.
- ✓ n°2 provette PAX tube da 2,5 ml.
- ✓ n°1 provetta PFA da 5 ml.

Per gli studi di metilazione e di modificazioni istoniche è stata utilizzata la provetta EDTA, centrifugata direttamente in azienda (15' a 2500 rpm). Si sono così ottenuti 400 µl di buffy coat, congelati tramite congelamento rapido in azoto liquido e inviati in vapori d'azoto al laboratorio dell'Università degli Studi di Milano per lo stoccaggio e la successiva estrazione del DNA.

2.3.2 Informazioni raccolte per ogni lavoratore

Tramite il questionario auto-compilato sono state raccolte informazioni dettagliate circa scolarità, abitudini al fumo, consumo di alcolici, attività svolta nel tempo libero, peso, altezza, caratteristiche delle abitazioni, esposizione extra-professionale a polveri, condizioni di traffico nella zona di residenza, mezzi utilizzati per recarsi al lavoro e minuti impiegati.

Variabili	
Età, media (DS) [anni]	44 (7.6)
Body Mass Index [Kg/m²]	26.5 (2.7)
Fumatori attuali, n (%)	
No	38 (60%)
Si	25 (40%)
Numero di sigarette, media (DS) [n/giorno]	13 (7.2)
Scolarità, n (%)	
Elementari	12 (19%)
Scuola Media	37 (59%)
Scuola Superiore	14 (22%)
PM₁₀,* n (%)	
74-162 µg/m ³	23 (36.5%)
165-210 µg/m ³	24 (38.1%)
223-1220 µg/m ³	16 (25.4%)

Tabella 1: Caratteristiche dei soggetti allo studio

* Livello medio di particolato con diametro inferiore a 10 µm (PM₁₀) stimato per ogni soggetto e categorizzati in terzili.

Ulteriori informazioni sono state raccolte al momento del prelievo su abitudini al fumo, dieta e uso di farmaci nei 7 giorni precedenti il prelievo e dettagliatamente sul reparto in cui il lavoratore ha esercitato le sue mansioni durante i tre giorni di lavoro intercorsi tra il primo e il secondo prelievo. Dai dati presenti in fabbrica (cartella sanitaria e libretto di rischio) sono state inoltre estratte informazioni sulla storia lavorativa dei singoli soggetti e sulla anamnesi patologica prossima e remota che ci permettesse di escludere soggetti con importanti patologie, soprattutto a carico dell'apparato cardiovascolare.

2.3.3 Determinazione dell'esposizione individuale a polveri e metallica

L'esposizione di ogni soggetto durante la giornata di lavoro è stata valutata sia come massa totale inalata (μg), sia come concentrazione ambientale media ($\mu\text{g}/\text{m}^3$). La frazione di polveri con diametro inferiore a $10 \mu\text{m}$ e $1 \mu\text{m}$ (PM_{10} e PM_1 rispettivamente) è risultata variare tra le diverse postazioni a causa delle diverse sorgenti di esposizione. Nella tabella 2 sono riportate tutte le postazioni occupate dai soggetti durante la settimana lavorativa in cui sono stati sottoposti a prelievo venoso.

Postazioni	$\mu\text{g}/\text{m}^3$	%PM	
		$\leq 1 \mu\text{m}$	$\leq 10 \mu\text{m}$
Cabina EAF	488.78	3.1	52
Spillaggio	3669.8	0.3	44.2
Area forno siviera LF	1863.7	1.4	35.4
Cabina colata continua	96.1	3.6	50.2
Centro ambiente colata continua	403.8	0.7	47.3
Cabina sivieristi	2329.2	0.7	58.2
Parco rottame	1377.9	0.5	45
Officina meccanica	324.6	3.5	60.1
Officina elettrica	1249.3	0.6	73.1
Pulpito centrale cabina conta lam 1	122.3	0.19	37.05
Cabina evacuazione laminatoio 1	397.3	0.71	65.87
Centro ambiente evacuazione lam 1	397.3	0.71	61.2
Pulpito centrale cabina conta lam 2	216	1.3	37.32
Centro ambiente lam 2	560.3	2.51	53.33

Tabella 2: Concentrazione di polveri in tutte le postazioni di lavoro

Per ogni postazione è stata rilevata la concentrazione totale di particolato espressa in $\mu\text{g}/\text{m}^3$, la percentuale di polveri con diametro uguale o minore a $1 \mu\text{m}$ (PM_{10}) e la percentuale di polveri con diametro uguale o minore a $10 \mu\text{m}$ (PM_{10}). Come si può osservare le concentrazioni totali variano da valori di 96 a oltre $3000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e risultano in generale molto elevate rispetto ai valori cui è sottoposta la popolazione generale in ambiente urbano, mentre corrispondono a quanto atteso in un moderno impianto siderurgico. La frazione di polveri ultrafini è risultata particolarmente elevata nelle postazioni Cabina EAF, Cabina colata continua, Officina meccanica e Centro ambiente laminatoio 2.

Esposizione	Media	DS	Min	Percentile			Max
				25 th	50 th	75 th	
PM₁₀ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	233.42	215.00	74.00	152	179.44	223.00	1220.17
PM₁ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	8.48	6.18	1.71	3.51	9.01	11.35	30.49
Part. Grezzo ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	224.94	208.99	71.51	148.60	170.13	211.03	1189.68
Cromo ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.09	0.03	0.02	0.08	0.09	0.10	0.20
Piombo ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	6.98	6.63	0.52	1.40	4.22	16.11	18.00
Cadmio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.005	0.007	0.001	0.001	0.002	0.007	0.03
Arsenico ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.18	0.21	0.005	0.016	0.072	0.500	0.500
Nickel ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0.43	0.26	0.10	0.24	0.34	0.62	0.90
Manganese ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	38.78	98.86	0.30	1.33	9.12	30.00	684.00

Tabella 3: Valori medi, deviazione standard, minimo, massimo di ciascuno degli indicatori di esposizione individuale a polveri e metalli.

Come descritto in precedenza, per ogni soggetto sono state calcolate la concentrazione totale giornaliera (μg) e la concentrazione media ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) tenendo conto delle diverse postazioni occupate durante il giorno lavorativo e i tempi di permanenza in ognuna. L'esposizione individuale così calcolata è riassunta in Tabella 3 dove sono riportati i valori medi, la deviazione standard e il minimo e il massimo di ciascuno degli indicatori di esposizione individuale a polveri utilizzati in analisi. I lavoratori allo studio risultano quindi esposti a valori medi di circa 10 volte più elevati rispetto alla popolazione generale residente in pianura padana, come mostrato in Tabella 4. Per una maggiore semplicità e per facilitare il confronto con i risultati riportati in letteratura i risultati successivi si riferiscono a PM_{10} medio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$). L'analisi con le esposizioni totali ha dato risultati sovrapponibili.

Area	I trim	II trim	III trim	IV trim
Milano	83.52	35.33	23.60	78.65
Brescia	65.12	34.30	29.00	53.35

Tabella 4: Concentrazione media di PM_{10} ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) a Milano e Brescia nell'anno 2005.

2.4 Analisi Statistiche

Dal momento che con l'utilizzo del pyrosequencing è possibile analizzare contemporaneamente molti siti di metilazione, si hanno a disposizione più misurazioni per ciascun lavoratore. Partendo dal presupposto che i nostri marcatori, pur andando a quantificare un fenomeno comune, vanno considerati separatamente l'uno dall'altro, si deve dire che, finora, un approccio comune è consistito nell'implementare dei semplici modelli di regressione (univariata e multivariata) utilizzando come outcome la media calcolata sulle misurazioni ripetute per ogni soggetto; tuttavia procedere in questo modo comporta una notevole perdita di informazione, nonché di potenza. Si è deciso quindi di considerare l'utilizzo di modelli multilevel che ci permettano di sfruttare l'informazione proveniente da tutte le misurazioni effettuate, tenendo però conto del fatto che queste misurazioni si distinguono per appartenenza a diversi soggetti, diversi siti e diversi istanti temporali. Considerando quindi i fattori "soggetto", "sito" e "turno" come fattori casuali è possibile introdurre nei modelli di regressione delle intercette casuali che ci permettano di correggere le stime fornite dai modelli per la correlazione esistente tra le misurazioni appartenenti ad uno stesso gruppo. Un attento esame della struttura dei dati ha permesso di comprendere che ci si trova in presenza di una struttura non gerarchica con le misurazioni crossclassificate in base a tre fattori. Potenzialmente, una misurazione/unità può appartenere ad una qualsiasi combinazione di livelli dei differenti fattori. Questo ovviamente è possibile solo considerando i tre (o due) siti esaminati all'interno della sequenza di DNA come equivalenti per tutti i soggetti, cosa che effettivamente corrisponde al vero poiché le posizioni dei nucleotidi sui cui sono state effettuate le analisi sono sempre le stesse per ciascun individuo. Analogamente, per ciò che riguarda il momento in cui sono stati effettuati i prelievi di

sangue, nonostante le date dei due prelievi non siano le stesse per tutti i soggetti, dal punto di vista biologico possono essere considerate.

2.4.1 Effetti a breve termine dell'esposizione a PM_{10} sulla metilazione del DNA

Per stabilire se ci sia o meno un effetto a breve termine dovuto al turno lavorativo, sono stati implementati, per ognuno dei marcatori di metilazione, dei modelli a effetti misti con i fattori casuali “soggetto” e “sito” cross-classificati e il fattore “turno” fisso; qui di seguito si mostra il modello scritto in notazione scalare:

$$y_{i(j_1,j_2)} = \beta_0 + \beta_1(\text{turno}) + \delta_{j_1} + \delta_{j_2} + \varepsilon_{i(j_1,j_2)}$$

dove β_0 rappresenta la risposta media, β_1 è il coefficiente di regressione relativo al turno, δ_{j_1} è l'effetto casuale dovuto ai soggetti, δ_{j_2} è l'effetto casuale dovuto al sito ed infine $\varepsilon_{i(j_1,j_2)}$ è il termine di errore residuo. Per valutare se ci sia o meno un'associazione tra la metilazione misurata dopo il turno lavorativo e l'esposizione a PM_{10} sono stati utilizzati ancora una volta dei modelli a effetti misti a 2 vie prendendo in considerazione solamente le misurazioni effettuate sui secondi campioni di sangue prelevati:

$$y_{i(j_1,j_2)} = \beta_0 + \beta_1(PM_{10}) + \beta_2X_2 + \dots + \beta_nX_n + \delta_{j_1} + \delta_{j_2} + \varepsilon_{i(j_1,j_2)}$$

dove β_0 è l'intercetta, β_1 è il coefficiente di regressione relativo al PM_{10} ; sono i coefficienti di regressione delle covariate incluse nel modello (età, BMI, fumo di sigaretta); e ancora è l'effetto casuale dovuto ai soggetti, è l'effetto casuale dovuto al sito $\varepsilon_{i(j_1,j_2)}$ e è il termine di errore residuo.

2.4.2 Effetti a lungo termine dell'esposizione a PM₁₀ sulla metilazione del DNA

Poiché l'esposizione a PM₁₀ misurata durante lo studio rappresenta quelli che di fatto sono i livelli di esposizione media cui solitamente sono sottoposti i lavoratori dell'acciaieria, per stimare gli effetti a lungo termine dell'esposizione a PM₁₀ sulla metilazione del DNA, abbiamo valutato l'associazione tra l'esposizione individuale a polveri sottili e la metilazione utilizzando le misurazioni relative a LINE-1, AluI e iNOS effettuate sia precedentemente al turno lavorativo che dopo il turno, assumendo che gli effetti del PM₁₀ si protraggono nel tempo producendo delle modificazioni simili nei due istanti temporali considerati. Per i marcatori di metilazione del DNA che non mostravano cambiamenti attribuibili al turno lavorativo nell'analisi degli effetti a breve termine sono stati implementati dei modelli a effetti misti a 2 vie analoghi al modello, ma prendendo in considerazione le misurazioni effettuate sui campioni provenienti da entrambi i prelievi. Per i marcatori per cui si è evidenziata una differenza significativa tra le misurazioni effettuate prima e dopo il turno lavorativo nell'analisi degli effetti a breve termine sono stati invece utilizzati dei modelli a effetti misti cross-classificati a tre vie come descritto qui di seguito:

$$y_{i(j_1, j_2, j_3)} = \beta_0 + \beta_1(\text{PM}_{10}) + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n + \delta_{j_1} + \delta_{j_2} + \delta_{j_3} + \varepsilon_{i(j_1, j_2)}$$

dove β_0 è l'intercetta complessiva, β_1 rappresenta l'effetto medio attribuibile al PM₁₀; β_1, \dots, β_n sono i coefficienti di regressione per le covariate incluse nel modello multivariato; δ_{j_1} è l'effetto casuale relativo al soggetto, δ_{j_2} è l'effetto casuale relativo al sito, mentre δ_{j_3} è l'effetto casuale dovuto al turno; $\varepsilon_{i(j_1, j_2, j_3)}$ il termine di errore residuo.

3. Risultati e Discussione

3.1 Progetto 1:

Questo articolo scientifico è stato accettato e pubblicato il 17 Dicembre 2010 sulla rivista *Environmental Health Perspectives*. Il titolo originale è:

“Effects of Short-Term Exposure to Inhalable Particulate Matter on Telomere Length, Telomerase Expression, and Telomerase Methylation in Steel Workers”

Autori: Laura Dioni, Mirjam Hoxha, Francesco Nordio, Matteo Bonzini, Letizia Tarantini, Benedetta Albetti, Alice Savarese, Joel Schwartz, Pier Alberto Bertazzi, Pietro Apostoli, Lifang Hou, and Andrea Baccarelli.

La LTL è risultata significativamente aumentata nei campioni post-esposizione (media 1.43 ± 0.51 SD), rispetto ai campioni al baseline (1.23 ± 0.28 SD, p-value <0.001) [Tabella 1]. La LTL post-esposizione è associata positivamente con i livelli di esposizione a PM₁₀ ($\beta_{\text{adj}} = 0.30$, p-value = 0.002) e PM₁ ($\beta_{\text{adj}} = 0.29$, p-value = 0.042) nei modelli aggiustati per potenziali confondenti.

Outcome	n ^a	Baseline		Postexposure		p-Value
		Mean \pm SD	Range	Mean \pm SD	Range	
White blood cells (10 ³ /mm ³)	62	7.31 \pm 1.6	3.6–10.4	7.3 \pm 1.7	4.0–13.0	0.91
Granulocytes (%)	62	58.9 \pm 7.2	43.5–76.0	58.2 \pm 7.6	44.6–80.6	0.23
Lymphocytes (%)	62	30.7 \pm 6.7	15.4–44.1	32.0 \pm 7.3	15.7–47.0	0.069
Monocytes (%)	62	10.4 \pm 3.5	4.5–19.4	9.8 \pm 3.5	3.7–17.5	0.22
LTL (T/S ratio)	57	1.23 \pm 0.28	0.68–1.86	1.43 \pm 0.51	0.72–3.34	<0.001
hTERT expression (2 ^{-$\Delta\Delta$CT})	58	1.68 \pm 0.86	0.72–4.86	1.31 \pm 0.75	0.52–5.55	<0.001
hTERT methylation (% 5mC)						
Position 1	59	93.9 \pm 1.0	90.5–96.8	93.9 \pm 1.1	89.9–96.8	0.84
Position 2	59	93.8 \pm 2.8	80.4–100.0	93.6 \pm 3.1	79.2–97.1	0.67
Position 3	59	90.0 \pm 1.9	86.3–95.5	90.2 \pm 1.5	85.9–93.2	0.36

Tabella 1: Conta leucocitaria, LTL, espressione di hTERT mRNA e metilazione del promotore di hTERT misurato in 63 i lavoratori della fonderia al baseline e al post-esposizione.

Non abbiamo trovato differenze legate all'esposizione della metilazione in nessuno dei siti CpG indagati nel promotore di hTERT. L'espressione di hTERT era inferiore nei campioni post-esposizione (media 1.31 ± 0.75 SD) rispetto al baseline (1.68 ± 0.86 SD, p -value <0.001), ma la diminuzione di espressione hTERT non ha evidenziato una relazione dose-risposta con l'esposizione a PM [Tabella 2].

Dependent variable	Exposure	Unadjusted		Adjusted ^a	
		β^b (95% CI)	p -Value	β^b (95% CI)	p -Value
LTL					
Baseline ($n = 57^c$)	PM ₁₀	0.06 (-0.03 to 0.16)	0.18	0.08 (-0.03 to 0.19)	0.13
	PM ₁	0.02 (-0.11 to 0.15)	0.71	0.07 (-0.09 to 0.22)	0.38
Postexposure ($n = 57^c$)	PM ₁₀	0.26 (0.10 to 0.42)	0.002	0.30 (0.11 to 0.49)	0.002
	PM ₁	0.25 (0.02 to 0.48)	0.037	0.29 (0.01 to 0.57)	0.042
Difference ^d ($n = 57^c$)	PM ₁₀	0.20 (0.07 to 0.33)	0.003	0.23 (0.08 to 0.38)	0.003
	PM ₁	0.22 (0.04 to 0.40)	0.016	0.21 (0.00 to 0.43)	0.051
hTERT expression					
Baseline ($n = 58^c$)	PM ₁₀	-0.20 (-0.50 to 0.10)	0.18	-0.05 (-0.36 to 0.26)	0.75
	PM ₁	-0.41 (-0.80 to -0.01)	0.042	-0.15 (-0.57 to 0.27)	0.47
Postexposure ($n = 58^c$)	PM ₁₀	-0.07 (-0.33 to 0.19)	0.60	-0.02 (-0.30 to 0.26)	0.89
	PM ₁	-0.15 (-0.49 to 0.20)	0.40	-0.01 (-0.39 to 0.38)	0.97
Difference ^d ($n = 58^c$)	PM ₁₀	0.13 (-0.12 to 0.39)	0.30	0.09 (-0.20 to 0.37)	0.54
	PM ₁	0.26 (-0.08 to 0.60)	0.13	0.20 (-0.16 to 0.57)	0.27

Tabella 2: Associazione di PM₁₀ e PM₁ con LTL, espressione hTERT mRNA misurate nei lavoratori della fonderia al baseline e al post-esposizione.

Non abbiamo trovato differenze legate all'esposizione in nessuno dei siti CpG di metilazione del promotore di hTERT [Tabella 3].

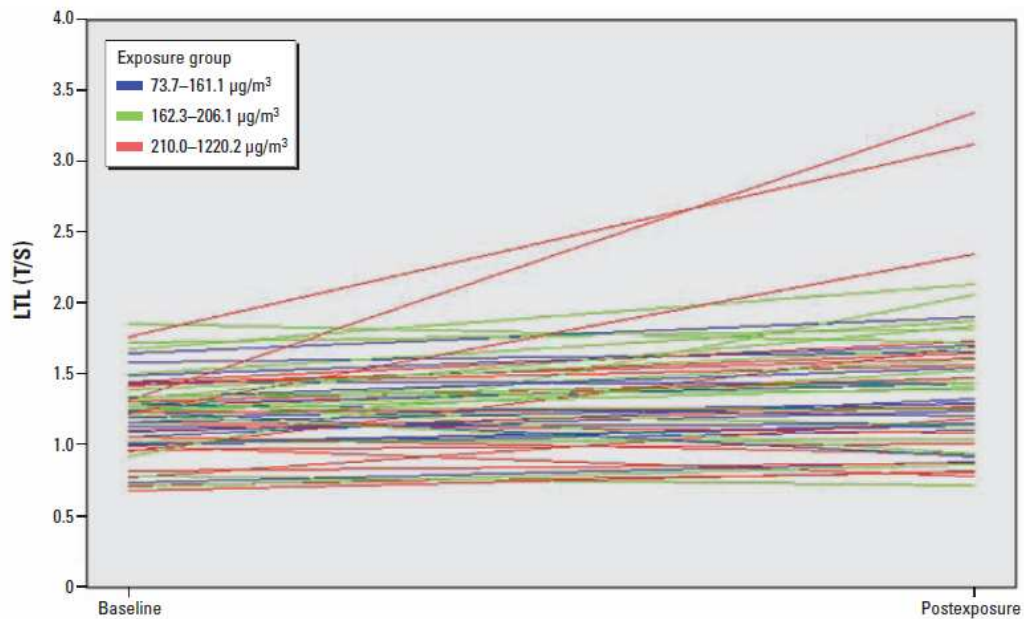


Figura 1: Cambiamenti entro-soggetto di LTL tra il primo giorno della settimana lavorativa (baseline) e dopo 3 giorni di lavoro (post-esposizione). Gli individui sono stati classificati in base ai terzili di PM_{10} .

<i>hTERT</i> methylation	Exposure	Unadjusted		Adjusted ^a	
		β^b (95% CI)	<i>p</i> -Value	β^b (95% CI)	<i>p</i> -Value
CpG position 1					
Baseline (<i>n</i> = 59 ^c)	PM_{10}	-0.02 (-0.39 to 0.36)	0.93	0.08 (-0.34 to 0.50)	0.71
	PM_1	-0.08 (-0.58 to 0.42)	0.76	-0.02 (-0.6 to 0.56)	0.95
Postexposure (<i>n</i> = 59 ^c)	PM_{10}	-0.13 (-0.55 to 0.28)	0.53	-0.15 (-0.62 to 0.32)	0.52
	PM_1	-0.13 (-0.68 to 0.43)	0.65	-0.13 (-0.76 to 0.50)	0.69
Difference ^d (<i>n</i> = 59 ^c)	PM_{10}	-0.11 (-0.65 to 0.42)	0.67	-0.24 (-0.84 to 0.36)	0.43
	PM_1	-0.05 (-0.77 to 0.67)	0.89	-0.03 (-0.83 to 0.77)	0.95
CpG position 2					
Baseline (<i>n</i> = 59 ^c)	PM_{10}	0.15 (-0.89 to 1.20)	0.77	0.05 (-1.18 to 1.27)	0.94
	PM_1	-0.15 (-1.55 to 1.26)	0.83	-0.32 (-2.00 to 1.36)	0.71
Postexposure (<i>n</i> = 59 ^c)	PM_{10}	-0.26 (-1.41 to 0.89)	0.65	-0.43 (-1.75 to 0.89)	0.52
	PM_1	-0.35 (-1.89 to 1.19)	0.65	-0.81 (-2.58 to 0.97)	0.36
Difference ^d (<i>n</i> = 59 ^c)	PM_{10}	-0.41 (-1.83 to 1.00)	0.56	-0.57 (-2.27 to 1.12)	0.50
	PM_1	-0.20 (-2.11 to 1.70)	0.83	-0.33 (-2.59 to 1.93)	0.77
CpG position 3					
Baseline (<i>n</i> = 59 ^c)	PM_{10}	-0.20 (-0.91 to 0.50)	0.56	-0.21 (-1.00 to 0.59)	0.61
	PM_1	-0.64 (-1.57 to 0.29)	0.18	-0.68 (-1.76 to 0.40)	0.21
Postexposure (<i>n</i> = 59 ^c)	PM_{10}	-0.73 (-1.24 to -0.22)	0.006	-0.70 (-1.26 to -0.13)	0.017
	PM_1	-1.00 (-1.69 to -0.32)	0.005	-1.00 (-1.76 to -0.25)	0.010
Difference ^d (<i>n</i> = 59 ^c)	PM_{10}	-0.53 (-1.19 to 0.13)	0.12	-0.55 (-1.30 to 0.20)	0.15
	PM_1	-0.37 (-1.27 to 0.54)	0.42	-0.21 (-1.22 to 0.81)	0.69

Tabella 3: Associazione fra esposizioni a PM_{10} e PM_1 con i livelli di metilazione di tre posizioni CpG nel promotore di *hTERT* al baseline e post-esposizione.

3.1.1 Discussione Progetto 1:

Nel presente studio, che ha coinvolto un campione di operai di una acciaieria con esposizione ben caratterizzata a PM, abbiamo trovato un aumento significativo dose-correlato di LTL (lunghezza dei telomeri dei leucociti) dopo esposizione a breve termine a PM. Tuttavia, questa correlazione non sembra essere spiegata da modificazioni di espressione nell'mRNA e della metilazione del DNA di hTERT (trascrittasi inversa telomerasica umana). La relazione fra PM e LTL trovata nel presente studio è in contrasto con precedenti relazioni presenti in letteratura. McCracken et al. riportano un'associazione inversa tra esposizioni a livelli di particolato carbonioso, tracce di PM da traffico veicolare, e LTL misurata nel sangue in una coorte di soggetti anziani nella parte orientale del Massachusetts¹⁶. Hoxha et al. hanno dimostrato che la LTL misurata nel sangue era più corta nei vigili urbani caratterizzati da una lunga esposizione ad agenti inquinanti di traffico rispetto a chi lavora in ufficio¹⁷. Gli autori hanno ipotizzato che un'esposizione a lungo termine a PM può causare la riduzione della LTL attraverso stress ossidativo indotto da PM a cui la struttura ricca in G (guanina) dei telomeri è più sensibile di quanto sia nel normale DNA genomico. Diversi modelli sperimentali in vitro hanno mostrato che durante l'infiammazione acuta, che è un processo centrale nella mediazione degli effetti sulla salute

¹⁶ McCracken J, Baccarelli A, Hoxha M, Dioni L, Coull B, Suh H, et al. 2010. *Annual ambient black carbon associated with shorter telomeres in elderly men: Veterans Administration Normative Aging Study*. Environ Health Perspect 118:1564–1570.

¹⁷ Hoxha M, Dioni L, Bonzini M, Pesatori AC, Fustinoni S, Cavallo D, et al. 2009. *Association between leukocyte telomere shortening and exposure to traffic pollution: a cross-sectional study on traffic officers and indoor office workers*. Environ Health 8:41; doi:10.1186/1476-069X-8-41 [Online 21 September 2009].

da esposizione a PM a breve termine¹⁸, si riscontra un aumento della lunghezza dei telomeri nelle cellule infiammatorie¹⁹. Questi studi sperimentali hanno indicato l'attivazione della telomerasi come un potenziale meccanismo determinante l'allungamento dei telomeri durante l'infiammazione acuta. Abbiamo per questo esaminato l'espressione dell'mRNA di hTERT e i livelli di metilazione del suo promotore. Tuttavia, i nostri risultati non spiegano un ruolo importante dell'espressione hTERT nel determinare l'aumento della LTL in soggetti umani esposti a PM. Infatti, abbiamo trovato livelli bassi di mRNA hTERT nei campioni rilevati dopo l'esposizione, che potrebbe rispecchiare l'inattivazione per feedback negativo della telomerasi in presenza di LTL allungata. Tuttavia, poiché la proteina hTERT è anche regolata a livello post-trascrizionale, e non abbiamo avuto una misura diretta delle attività della telomerasi nel nostro studio, non possiamo escludere che l'attivazione della telomerasi abbia un ruolo nel determinare un aumento della LTL. Oltre alla telomerasi, l'insieme di proteine associate ai telomeri è estremamente complesso e i precisi meccanismi molecolari che regolano la lunghezza dei telomeri nei linfociti o altri tipi di cellule non sono pienamente compresi²⁰. Non abbiamo trovato consistenti associazioni di esposizione a PM con l'espressione di hTERT mRNA e la metilazione. Vale la pena notare che indagini precedenti che correlano la metilazione hTERT con la sua espressione hanno mostrato entrambe le associazioni positive e negative²¹. Liu et al. suggeriscono che queste correlazioni incoerenti possono essere dovute al coinvolgimento di una grande varietà di

¹⁸ Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, et al. 2004. *Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association*. *Circulation* 109:2655–2671.

¹⁹ Weng NP, Granger L, Hodes RJ. 1997. *Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation*. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:10827–10832.

²⁰ Hodes RJ, Hathcock KS, Weng NP. 2002. *Telomeres in T and B cells*. *Nat Rev Immunol* 2:699–706.

²¹ Dessain SK, Yu H, Reddel RR, Beijersbergen RL, Weinberg RA. 2000. *Methylation of the human telomerase gene CpG island*. *Cancer Res* 60:537–541.

fattori di trascrizione che interagiscono con il promotore hTERT²². Studi futuri sugli effetti del PM dovrebbero tenere conto della complessità della regolazione della telomerasi considerando molteplici meccanismi di regolazione e ottenere misure dirette della attività della telomerasi. Per le cellule infiammatorie, la capacità di subire la divisione cellulare e una estesa espansione clonale è di fondamentale importanza per l'efficace generazione di una risposta infiammatoria. Le cellule con telomeri accorciati perdono la loro capacità di dividersi e diventare senescenti o subire apoptosi. Al contrario, i telomeri più lunghi garantiscono il mantenimento della capacità delle cellule di rapida proliferazione. Questi meccanismi sono stati ampiamente dimostrati in sottopopolazioni linfocitarie coinvolte nell'infiammazione acuta, compresi quelli nel sangue periferico. Espansione clonale di leucociti circolanti, che si verifica rapidamente in sottopopolazioni con telomeri più lunghi, dovrebbe portare queste sottopopolazioni ad essere più rappresentate nel sangue periferico e quindi portare a un aumento medio di LTL. Nei nostri dati, abbiamo trovato un moderato, non significativo incremento della percentuale di linfociti circolanti nel sangue tra i campioni al baseline e al post-esposizione. Questo aumento non è stato marcato come quello osservato per la LTL; pertanto è evidente che specifiche sottopopolazioni di linfociti, come le sottopopolazioni di cellule T o B, hanno proliferato maggiorante. In alternativa, la migrazione dei leucociti meno maturi (che hanno subito un minor numero di divisioni cellulari e sono tenuti ad avere telomeri più lunghi) dal midollo osseo al sangue potrebbe avere contribuito all'aumento di LTL nei campioni post-esposizione. In effetti, precedenti studi hanno dimostrato che le risposte infiammatorie sistemiche all'esposizione PM sono

²² Liu K, Hodes RJ, Weng N. 2001. *Cutting edge: telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase in telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation.* J Immunol 166:4826–4830.

associate con la presenza di leucociti meno maturi nel sangue periferico²³. Gli studi futuri in soggetti esposti a PM dovrebbero misurare la LTL dopo la separazione di specifiche sottopopolazioni di leucociti in base alle loro funzioni e la maturità. Il nostro disegno dello studio ha incluso misure di LTL, espressione di hTERT mRNA, e metilazione di hTERT in campioni di sangue da leucociti prelevati il primo e il quarto giorno di una settimana lavorativa. I due campioni sono stati raccolti per identificare fluttuazioni di breve periodo associate al ciclo settimanale di esposizione dovuto al lavoro nello stabilimento durante la settimana, seguita dalla cessazione dell'esposizione durante i 2 giorni di riposo tra le settimane consecutive. Abbiamo studiato una popolazione con esposizione ben caratterizzata, che ha permesso anche il contrasto di soggetti su un'ampia gamma di diversi livelli di esposizione. Il nostro studio si è basato su soggetti che lavorano in diverse aree di lavoro della stessa fabbrica e non comprende una popolazione di soggetti diversi, senza una specifica condizione di esposizione a sostanze inquinanti per via inalatoria. Tuttavia, la nostra valutazione primaria degli effetti a breve termine dell'esposizione PM era basata su un confronto tra campioni al baseline e i campioni dopo l'esposizione degli stessi soggetti, in cui ciascun soggetto è servito come il suo controllo. Inoltre, nei modelli di regressione che valutano la relazione dose-risposta dei livelli di esposizione a PM con le misure di esposizione al baseline o post-esposizione di LTL, i livelli di hTERT mRNA, e la metilazione hTERT, abbiamo controllato per potenziali confondenti inserendo nei modelli multivariati come variabili indipendenti diverse caratteristiche individuali.

²³ Suwa T, Hogg JC, Quinlan KB, Ohgami A, Vincent R, van Eeden SF. 2002. *Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis*. J Am Coll Cardiol 39:935–942.

3.1.2 Conclusione Progetto 1:

Il nostro studio ha mostrato un aumento LTL da sangue associato ad esposizione a breve termine a PM in un gruppo di lavoratori di un'industria siderurgica. Non abbiamo trovato prove che l'aumento di LTL è mediato dai cambiamenti nell'espressione di hTERT mRNA e la metilazione hTERT. Sono necessari nuovi studi per chiarire i meccanismi che sono alla base dell'aumento di LTL indotta da esposizione a PM.

3.2 Progetto 2:

Questo articolo scientifico è stato accettato e pubblicato l'8 Marzo 2011 sulla rivista *Environmental Health Perspectives*. Il titolo originale è:

Inhalable Metal-Rich Air Particles and Histone H3K4 Dimethylation and H3K9 Acetylation in a Cross-sectional Study of Steel Workers

Autori: Laura Cantone, Francesco Nordio, Lifang Hou, Pietro Apostoli, Matteo Bonzini, Letizia Tarantini, Laura Angelici, Valentina Bollati, Antonella Zanobetti, Joel Schwartz, Pier A. Bertazzi, Andrea Baccarelli.

Exposure	Aluminum	Manganese	Nickel	Zinc	Arsenic	Lead	Iron	PM ₁₀	PM ₁
Aluminum	1								
Manganese	0.75 <0.0001	1							
Nickel	0.46 0.0001	0.39 0.0017	1						
Zinc	0.18 0.1625	0.21 0.1034	0.32 0.0105	1					
Arsenic	0.15 0.2378	0.31 0.0143	0.84 0.0000	0.25 0.0483	1				
Lead	0.75 <0.0001	0.99 <0.0001	0.38 0.0018	0.35 0.0047	0.28 0.0265	1			
Iron	0.15 0.2451	0.28 0.0261	0.76 <0.0001	0.48 0.0001	0.70 <0.0001	0.32 0.0113	1		
PM ₁₀	0.81 <0.0001	0.82 <0.0001	0.34 0.0056	0.34 0.0070	0.04 0.7446	0.85 <0.0001	0.27 0.0294	1	
PM ₁	0.63 <0.0001	0.60 <0.0001	0.22 0.0897	0.28 0.0277	-0.20 0.1195	0.64 <0.0001	0.26 0.0408	0.90 <0.0001	1

Tabella 1: Matrice di correlazione tra esposizioni individuali (componenti metalliche del PM)

Sia H3K4me2 e H3K9ac aumentato in associazione con gli anni di lavoro nell'impianto (p-trend = 0.04 e 0.006, rispettivamente) [Tabella 2]. H3K4me2 aumentato in associazione con il nickel ($\beta = 0.16$, 95% CI: 0.03-0.3), l'arsenico ($\beta = 0.16$, 95% CI: 0.02-0.3) e il ferro ($\beta = 0.14$, 95% CI: 0.01-0.26) [Tabella 3].

H3K9ac ha mostrato associazioni positive non significative con il nichel ($\beta = 0.24$, 95% CI: -0.02-0.51), l'arsenico ($\beta = 0.21$, 95% CI: -0.06 – 0.48), e il ferro ($\beta = 0.22$, 95% CI: -0.03-0.47)

Variable	n	H3K4me2		H3K9ac		Variable	n	H3K4me2		H3K9ac	
		Mean OD (95% CI)	p-Value ^a	Mean OD (95% CI)	p-Value ^a			Mean OD (95% CI)	p-Value ^a		
Age (years)						Education					
< 39	22	0.90 (0.79–1.02)		0.41 (0.22–0.59)		Primary school	12	0.96 (0.83–1.09)		0.25 (0.05–0.45)	
39–47	20	1.00 (0.96–1.05)		0.43 (0.26–0.59)		Middle school	37	0.94 (0.89–0.99)		0.43 (0.31–0.56)	
> 47	21	0.94 (0.88–1.00)	0.47	0.43 (0.27–0.58)	0.88	High school	14	0.96 (0.81–1.10)	0.98	0.55 (0.36–0.74)	0.04
BMI (kg/m ²)						Area of residence					
< 25	21	0.96 (0.9–1.02)		0.48 (0.33–0.62)		City center	8	0.89 (0.54–1.23)		0.30 (0.05–0.64)	
25–27.5	21	0.89 (0.78–1.01)		0.20 (0.04–0.35)		Suburbs	41	0.97 (0.92–1.01)		0.49 (0.38–0.60)	
> 27.5	21	0.99 (0.95–1.03)	0.57	0.59 (0.45–0.74)	0.36	Rural	12	0.91 (0.79–1.03)	0.94	0.26 (0.02–0.50)	0.43
Smoking						Self-reported traffic intensity near home					
Nonsmoker	24	0.96 (0.88–1.04)		0.44 (0.28–0.61)		High	5	0.86 (0.43–1.29)		0.39 (0.15–0.92)	
Former smoker	14	0.87 (0.76–0.97)		0.35 (0.12–0.59)		Medium	38	0.94 (0.89–1.00)		0.46 (0.33–0.58)	
Current smoker	25	0.98 (0.92–1.05)	0.14 ^b	0.43 (0.30–0.57)	0.76 ^b	Low	18	0.97 (0.91–1.03)	0.26	0.36 (0.18–0.53)	0.57
No. of cigarettes/day						Granulocyte (%)					
0	38	0.93 (0.87–0.99)		0.41 (0.28–0.54)		45–55	21	0.95 (0.88–1.01)		0.43 (0.3–0.57)	
1–10	10	0.98 (0.92–1.05)		0.39 (0.23–0.55)		55–61	21	0.94 (0.82–1.06)		0.42 (0.19–0.65)	
> 10	15	0.98 (0.87–1.09)	0.29	0.46 (0.24–0.68)	0.69	61–76	21	0.96 (0.91–1.02)	0.76	0.41 (0.28–0.54)	0.86
Smoking duration (years)						Years of employment					
0	23	0.97 (0.88–1.05)		0.45 (0.28–0.62)		< 9	20	0.88 (0.75–1.00)		0.22 (0.04–0.39)	
0–19	19	0.90 (0.8–1.00)		0.35 (0.15–0.54)		9–21	17	0.96 (0.91–1.02)		0.43 (0.28–0.58)	
> 19	21	0.97 (0.91–1.03)	0.94	0.45 (0.32–0.58)	0.98	> 21	22	0.99 (0.95–1.04)	0.04	0.51 (0.37–0.66)	0.006
Pack-years											
0	24	0.96 (0.88–1.04)		0.44 (0.28–0.61)							
0–4	17	0.92 (0.84–0.99)		0.39 (0.22–0.57)							
> 4	20	0.95 (0.86–1.04)	0.79	0.43 (0.25–0.61)	0.90						

Tabella 2: Associazione fra le caratteristiche dei soggetti con H3K4me2 e H3K9ac (in unita OD) misurati al quarto giorno della settimana lavorativa.

Exposure	Association with H3K4me2				Association with H3K9ac			
	Unadjusted		Adjusted ^a		Unadjusted		Adjusted ^a	
	β -Coefficient (95% CI)	p-Value	β -Coefficient (95% CI)	p-Value	β -Coefficient (95% CI)	p-Value	β -Coefficient (95% CI)	p-Value
Aluminium	0.01 (-0.02 to 0.04)	0.36	0.02 (-0.01 to 0.05)	0.24	-0.04 (-0.11 to 0.02)	0.15	-0.03 (-0.1 to 0.03)	0.33
Manganese	0.02 (-0.01 to 0.04)	0.21	0.02 (-0.01 to 0.05)	0.17	-0.03 (-0.08 to 0.02)	0.25	-0.01 (-0.06 to 0.04)	0.73
Nickel	0.15 (0.03 to 0.28)	0.02	0.16 (0.03 to 0.3)	0.02	0.22 (-0.04 to 0.48)	0.10	0.24 (-0.02 to 0.51)	0.07
Zinc	0.05 (-0.01 to 0.11)	0.08	0.05 (-0.01 to 0.12)	0.12	-0.05 (-0.18 to 0.07)	0.41	-0.06 (-0.19 to 0.07)	0.38
Arsenic	0.16 (0.03 to 0.28)	0.02	0.16 (0.02 to 0.3)	0.02	0.18 (-0.08 to 0.45)	0.17	0.21 (-0.06 to 0.48)	0.13
Lead	0.02 (-0.01 to 0.04)	0.19	0.02 (-0.01 to 0.05)	0.16	-0.04 (-0.09 to 0.02)	0.16	-0.02 (-0.08 to 0.04)	0.52
Iron	0.12 (0.01 to 0.24)	0.04	0.14 (0.01 to 0.26)	0.03	0.21 (-0.02 to 0.45)	0.08	0.22 (-0.03 to 0.47)	0.08
PM ₁₀	0.03 (-0.03 to 0.09)	0.34	0.04 (-0.03 to 0.11)	0.23	-0.08 (-0.2 to 0.04)	0.17	-0.04 (-0.17 to 0.09)	0.51
PM ₁	0.02 (-0.06 to 0.1)	0.64	0.03 (-0.06 to 0.13)	0.45	-0.04 (-0.2 to 0.13)	0.65	0.00 (-0.18 to 0.18)	0.97

Tabella 3. Associazione fra esposizione individuale a componenti metalliche del PM e massa del PM con H3K4me2 e H3K9ac.

Esposizioni cumulative a nichel e arsenico, definito come il prodotto di anni di lavoro per livelli di metallo, sono correlati positivamente sia con H3K4me2 (nichel: $\beta = 0.16$, 95% CI:

0.01-0.3; arsenico: $\beta = 0.16$, 95% CI: 0.03-0.29) sia con H3K9ac (nicel: $\beta = 0.27$, 95% CI: 0.01-0.54; arsenico: $\beta = 0.28$, 95% CI: 0.04-0.51) [Tabella 4] .

Exposure	Association with H3K4me2				Association with H3K9ac			
	Unadjusted		Adjusted ^b		Unadjusted		Adjusted ^b	
	β -Coefficient (95% CI)	p -Value	β -Coefficient (95% CI)	p -Value	β -Coefficient (95% CI)	p -Value	β -Coefficient (95% CI)	p -Value
Aluminium	0.01 (-0.03 to 0.04)	0.61	0.02 (-0.02 to 0.06)	0.44	-0.02 (-0.09 to 0.04)	0.48	-0.03 (-0.1 to 0.05)	0.48
Manganese	0.01 (-0.02 to 0.04)	0.33	0.02 (-0.02 to 0.05)	0.35	-0.01 (-0.07 to 0.04)	0.63	0.00 (-0.06 to 0.05)	0.86
Nickel	0.11 (-0.01 to 0.23)	0.07	0.16 (0.01 to 0.3)	0.03	0.26 (0.04 to 0.49)	0.02	0.27 (0.01 to 0.54)	0.04
Zinc	0.06 (-0.03 to 0.15)	0.21	0.06 (-0.05 to 0.17)	0.30	-0.02 (-0.21 to 0.16)	0.80	-0.03 (-0.24 to 0.18)	0.78
Arsenic	0.14 (0.03 to 0.26)	0.01	0.16 (0.03 to 0.29)	0.02	0.30 (0.09 to 0.51)	0.01	0.28 (0.04 to 0.51)	0.02
Lead	0.02 (-0.02 to 0.06)	0.35	0.02 (-0.03 to 0.06)	0.38	-0.03 (-0.11 to 0.05)	0.42	-0.02 (-0.1 to 0.06)	0.65
Iron	0.09 (-0.03 to 0.21)	0.14	0.12 (-0.02 to 0.27)	0.09	0.25 (0.03 to 0.48)	0.03	0.24 (-0.03 to 0.5)	0.08
PM ₁₀	0.03 (-0.04 to 0.11)	0.41	0.05 (-0.04 to 0.14)	0.26	0.00 (-0.14 to 0.15)	0.99	0.00 (-0.17 to 0.17)	0.97
PM ₁	0.03 (-0.07 to 0.13)	0.53	0.07 (-0.06 to 0.21)	0.29	0.08 (-0.11 to 0.28)	0.40	0.08 (-0.17 to 0.32)	0.54

Tabella 4. Associazione fra esposizione cumulativa a componenti metalliche del PM e massa del PM con H3K4me2 e H3K9ac.

3.2.1 Discussione Progetto 2:

Il presente studio, basato su una popolazione di lavoratori sani di un'acciaieria vicino a Brescia, ha mostrato che l'esposizione ad alcuni componenti metallici del PM è associata a modificazioni istoniche misurate in leucociti da sangue periferico. In particolare, abbiamo verificato che entrambi le modificazioni H3K4me2 e H3K9ac erano più alte nei soggetti con più anni di impiego nello stabilimento e con una maggiore esposizione cumulativa ad arsenico e nichel. Sulla base delle nostre conoscenze questo è il primo studio che mostra delle associazioni tra esposizione a metalli, quali nichel, arsenico e ferro, e modificazioni istoniche nell'uomo. Il nostro studio si è basato su misure di modificazioni istoniche nei leucociti da sangue periferico in soggetti sani, suggerendo che le alterazioni di tali modificazioni, legate all'esposizione, potrebbero verificarsi nei tessuti normali e possibilmente anticipare l'insorgenza della malattia. L'effetto dell'esposizione a metalli su H3K4me2 nei leucociti da sangue è coerente con precedenti studi tossicologici in vitro, i quali hanno dimostrato che i metalli cancerogeni aumentano H3K4me2 nelle cellule umane

del carcinoma del polmone (A549)²⁴. In particolare, i nostri risultati hanno mostrato un'associazione tra l'esposizione a nichel e arsenico e l'aumento di H3K4me2, coerentemente con quanto dimostrato precedentemente in studi in vitro²⁵. Nel nostro studio, abbiamo identificato una correlazione tra H3K4me2 e i livelli di esposizione a nichel, arsenico e ferro, ma solo nichel e arsenico hanno mostrato associazioni significative con H3K4me2 quando abbiamo valutato le esposizioni cumulative. Inoltre, abbiamo trovato associazioni significative tra le esposizioni cumulative a nichel e arsenico e l'aumento di H3K9ac. I cambiamenti osservati nei precedenti studi in vitro su cellule di carcinoma del polmone e nel nostro studio su leucociti, suggeriscono che l'induzione di modificazioni istoniche attivanti, quali H3K4me2 e H3K9ac potrebbe rappresentare un processo sistemico rilevabile attraverso diversi tessuti. Tuttavia, rimane da confermare con studi futuri se le modificazioni di H3K4me2 e H3K9ac possano essere alterate nei tessuti polmonari umani esposti in vivo a metalli cancerogeni. L'inalazione di componenti metalliche del PM ha dimostrato di indurre stress ossidativo e processi infiammatori, che sono noti influenzare le modificazioni istoniche^{26 27} e nello specifico potrebbero influenzare le misure delle modificazioni istoniche nelle cellule del sangue. Una serie di studi sperimentali che hanno utilizzato PM₁₀ ambientale, raccolto nella Utah Valley (USA) nei pressi di un impianto siderurgico locale, hanno dimostrato che il PM di origine antropica contenente metalli di

²⁴ Sun H, Zhou X, Chen H, Li Q, Costa M, *Modulation of histone methylation and MLH1 gene silencing by hexavalent chromium*. Toxicol Appl Pharmacol. 2009 Jun 15;237(3):258-66.

²⁵ Zhou X, Li Q, Arita A, Sun H, Costa M. *Effects of nickel, chromate, and arsenite on histone 3 lysine methylation*; Toxicol Appl Pharmacol. 2009 Apr 1;236(1):78-84.

²⁶ Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM, MacNee W, *Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10)*; Free Radic Biol Med. 2003 Jun 1;34(11):1369-82.

²⁷ Gilmour PS, Rahman I, Donaldson K, MacNee W, *Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003 Mar;284(3):L533-40. Epub 2002 Nov 22.

transizione biodisponibili accentua gli effetti infiammatori acuti, e che la capacità del PM di generare stress ossidativo è maggiore nel PM con più alto contenuto di metalli^{28 29}. Studi precedenti hanno dimostrato che le esposizioni al PM o a sostanze inquinanti disperse nell'aria sono associate a cambiamenti nell'espressione di geni pro infiammatori e geni correlati al tumore nei leucociti del sangue^{30 31} e con marcatori di controllo dell'espressione genica come la metilazione del DNA. Abbiamo studiato una popolazione con esposizione ben caratterizzata che ci ha permesso di confrontare i soggetti con un ampio *range* di livelli di esposizione. Abbiamo corretto per diversi potenziali confondenti adattando dei modelli di regressione multipla che comprendevano diverse caratteristiche individuali come variabili indipendenti. Tuttavia, non possiamo escludere la possibilità che altre esposizioni non misurate ma presenti in impianti di fonderia, come il calore, il monossido di carbonio, e le radiazioni non ionizzanti, possano avere influenzato le modificazioni di H3K4me2 e H3K9ac. Nell'analisi univariata, abbiamo identificato un'associazione positiva di H3K9ac con il livello di istruzione dei soggetti allo studio. Anche se il nostro studio non ha fornito informazioni per valutare le basi biologiche di questa associazione, i nostri risultati hanno dimostrato che stime aggiustate e non aggiustate per gli effetti dei metalli sulle modificazioni degli istoni erano molto simili, suggerendo che il confondimento dovuto al livello di istruzione e altre variabili incluse nei nostri modelli è improbabile.

²⁸ Dye JA, Lehmann JR, McGee JK, Winsett DW, Ledbetter AD, Everitt JI, Ghio AJ, Costa DL. Acute pulmonary toxicity of particulate matter filter extracts in rats: coherence with epidemiologic studies in Utah Valley residents. *Environ Health Perspect.* 2001 Jun;109 Suppl 3:395-403.

²⁹ Ghio AJ, Devlin RB, *Inflammatory lung injury after bronchial instillation of air pollution particles*; *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Aug 15;164(4):704-8.

³⁰ Feinberg AP, Tycko B, *The history of cancer epigenetics*; *Nat Rev Cancer.* 2004 Feb;4(2):143-53.

³¹ MacNee W, Donaldson K, *Mechanism of lung injury caused by PM₁₀ and ultrafine particles with special reference to COPD*; *Eur Respir J Suppl.* 2003 May;40:47s-51s.

3.2.2 Conclusione Progetto 2:

I nostri risultati suggeriscono che l'esposizione ad alcune componenti metalliche del PM, tra cui nickel e arsenico, correlano con un aumento di due modificazioni istoniche (H3K4me2 e H3K9ac) attivanti l'espressione genica nei leucociti del sangue in lavoratori sani di acciaieria. Alterazioni a livello genomico delle modificazioni istoniche possono influenzare l'espressione genica e contribuire alle proprietà cancerogene di nickel e arsenico inalabili. Successivi studi sono necessari per correlare direttamente questi cambiamenti con il rischio di cancro legato all'esposizione. Inoltre, si potranno individuare geni-specifici e *pathway* influenzati dalle modificazioni istoniche alterate dall'esposizione.

3.3 Progetto 3:

Questo articolo scientifico è stato accettato e pubblicato il 30 Agosto 2011 sulla rivista *Particle and Fibre Toxicology*. Il titolo originale è:

Ambient PM exposure and DNA methylation in tumor suppressor genes: a cross-sectional study

Lifang Hou, Xiao Zhang, Letizia Tarantini, Francesco Nordio, Matteo Bonzini, Laura Angelici, Barbara Marinelli, Giovanna Rizzo, Laura Cantone, Pietro Apostoli, Pier Alberto Bertazzi and Andrea Baccarelli

Abbiamo confrontato la metilazione del DNA nei campioni al baseline con quelli raccolti dopo l'esposizione [Tabella 1]. La metilazione di APC ha mostrato un aumento non significativo in tutti e quattro i siti CpG valutati. Quando i quattro siti CpG sono stati combinati, i livelli di metilazione media di APC aumentavano significativamente dalla baseline (4.65 %5mC) alla post-esposizione (4.89 %5mC, p-value = 0.005). I livelli di metilazione del DNA nei sette siti CpG di p16 ha mostrato *pattern* inconsistenti. Solo in uno dei sette siti la metilazione aumenta in modo significativo nei campioni post-esposizione (da baseline 2.02 %5mC a 2.34 %5mC, p-value = 0.012). I rimanenti sei siti CpG non hanno mostrato un aumento statisticamente significativo nei campioni post-esposizione. Il valore medio livello della metilazione dei sette siti CpG combinati ha mostrato un significativo incremento da 2.20 %5mC alla baseline a 2.34 %5mC dopo 4 giorni di lavoro (post-esposizione) (p-value = 0.006). Contrariamente, la metilazione di p53 è diminuita in modo significativo nel quarto sito CpG (da 6.96 %5mC a 6.59 %5mC, p-value = 0.006), ma non negli altri tre siti CpG. La metilazione media dei quattro siti combinati di p53 ha mostrato una significativa diminuzione da 6.36 %5mC nei campioni al baseline a 6.16 %5mC nei campioni post-esposizione (p-value = 0.015).

CpG site	N	DNA methylation				
		Baseline sample		Post-exposure sample		p-value
APC (%5 mC)						
site 1	60	5.77	(5.41; 6.13)	6.13	(5.77; 6.49)	0.06
site 2	60	5.39	(5.10; 5.68)	5.45	(5.16; 5.74)	0.72
site 3	60	3.63	(3.32; 3.93)	3.92	(3.62; 4.23)	0.11
site 4	60	3.86	(3.56; 4.15)	4.06	(3.77; 4.35)	0.25
All sites combined	60	4.65	(3.70; 5.61)	4.89	(3.94; 5.85)	0.005
p16 (%5 mC)						
site 1	61	2.02	(1.81; 2.22)	2.34	(2.13; 2.55)	0.012
site 2	61	2.75	(2.51; 2.98)	2.9	(2.66; 3.14)	0.20
site 3	61	1.66	(1.43; 1.89)	1.88	(1.65; 2.11)	0.11
site 4	61	2.21	(2.05; 2.36)	2.17	(2.01; 2.33)	0.70
Site5	61	1.84	(1.57; 2.12)	1.93	(1.65; 2.20)	0.60
Site 6	61	1.71	(1.49; 1.92)	1.78	(1.56; 2.00)	0.58
Site 7	61	3.11	(2.83; 3.40)	3.31	(3.03; 3.60)	0.15
All sites combined	61	2.2	(1.78; 2.62)	2.34	(1.92; 2.76)	0.006
p53 (%5 mC)						
site 1	58	3.02	(2.83; 3.22)	2.93	(2.73; 3.13)	0.16
site 2	58	11.88	(11.26; 12.50)	11.56	(10.94; 12.18)	0.13
site 3	58	3.57	(3.37; 3.78)	3.56	(3.35; 3.76)	0.85
site 4	58	6.96	(6.52; 7.41)	6.59	(6.14; 7.03)	0.006
All sites combined	58	6.36	(2.93; 9.79)	6.16	(2.73; 9.60)	0.015
RASSF1A (%5 mC)						
site 1	57	3.68	(3.23; 4.13)	3.14	(2.69; 3.59)	0.003
site 2	57	10.14	(9.01; 11.27)	8.59	(7.45; 9.72)	< 0.001
site 3	57	8.43	(7.16; 9.70)	7.21	(5.94; 8.49)	0.009
site 4	57	10.61	(9.34; 11.88)	9.22	(7.95; 10.49)	0.002
All sites combined	57	8.17	(5.44; 10.90)	7.08	(4.36; 9.81)	< 0.001

Tabella 1: Promotore sito CpG metilazione del DNA di quattro geni soppressori del tumore misurati nei campioni di post-esposizione e di baseline.

La metilazione di RASSF1A ha mostrato una consistente riduzione significativa in tutti e quattro siti CpG valutati. Il valore medio della metilazione dato dalla combinazione dei quattro siti CpG di RASSF1A è diminuito significativamente dall'8,17 %5mC nei campioni al baseline al 7,08 %5mC nei campioni post-esposizione (p-value <0.001).

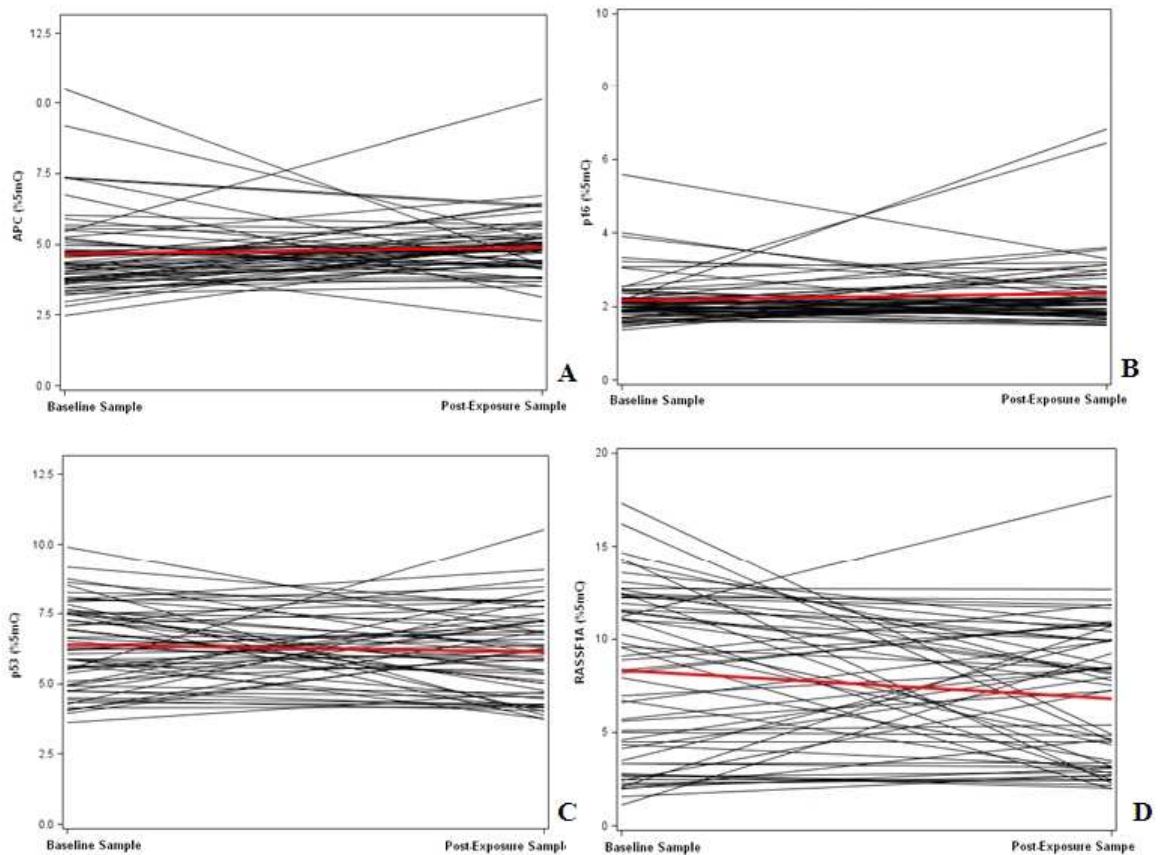


Figura 1: livelli di metilazione del DNA misurati nei campioni baseline e post-esposizione. Lo spaghetti plot mostra i livelli di metilazione individuale del DNA in APC (A), P16 (B), P53 (C), RASSF1A (D) (linee nere) e la variazione media (in grassetto le linee rosse) tra i campioni al basale e post-esposizione.

Il livello di metilazione media dei quattro siti CpG nella regione del promotore APC era positivamente associato con i livelli di PM_{10} ($\beta_{std} = 0.27$, CI 95%: 0.14-0.40), PM_{1} ($\beta_{std} = 0.23$, CI 95%: 0.10-0.37) e alluminio ($\beta_{std} = 0.15$, CI 95%: 0.00-0.29) nei modelli di

regressione aggiustati. La regressione aggiustata ha confermato associazioni significative della metilazione di APC con PM₁₀ ($\beta_{std} = 0.27$, CI 95%: 0.13-0.40) e PM₁ ($\beta_{std} = 0.23$, 95% CI: 0.09-0.38), e una associazione *borderline* con l'alluminio ($\beta_{std} = 0.14$, CI 95%: 0.00-0.29). Il livello di metilazione media dei sette siti CpG del promotore p16 era positivamente associato a livelli di zinco sia nel modello di regressione non aggiustato ($\beta_{std} = 0.18$, 95% CI 0.00-0.35) che in quello non aggiustato ($\beta_{std} = 0.19$, CI 95%: 0.02-0.37). La metilazione del promotore RASSF1A misurata nei quattro siti CpG era negativamente associata con il livello di esposizione a zinco sia nel modello di regressione non aggiustato ($\beta_{std} = -0.18$, 95% CI: -0.35-0.01) che in quello aggiustato ($\beta_{std} = -0.21$, 95% CI: -0.37-0.05). La metilazione di p53 non ha mostrato alcuna associazione significativa con le esposizioni valutate [Tabella 2].

Exposures	APC		p16		p53		RASSF1A	
	β_{std}	95% CI	β_{std}	95% CI	β_{std}	95% CI	β_{std}	95% CI
Unadjusted regression								
PM ₁₀	0.27 ^a	0.14 to 0.40	0.02	-0.17 to 0.20	0.00	-0.12 to 0.11	0.01	-0.16 to 0.18
PM ₁	0.23 ^b	0.10 to 0.37	0.02	-0.16 to 0.20	-0.06	-0.17 to 0.04	-0.01	-0.18 to 0.16
Aluminium	0.15 ^c	0.00 to 0.29	0.00	-0.18 to 0.18	0.04	-0.07 to 0.15	0.01	-0.15 to 0.18
Manganese	0.11	-0.03 to 0.26	-0.03	-0.22 to 0.15	-0.02	-0.15 to 0.11	0.11	-0.05 to 0.28
Nickel	0.08	-0.07 to 0.23	0.00	-0.18 to 0.18	0.04	-0.06 to 0.14	-0.02	-0.19 to 0.15
Zinc	0.06	-0.08 to 0.21	0.18 ^c	0.00 to 0.35	-0.06	-0.15 to 0.03	-0.18 ^c	-0.35 to -0.01
Arsenic	0.01	-0.15 to 0.17	-0.02	-0.20 to 0.16	0.05	-0.05 to 0.15	0.01	-0.17 to 0.18
Lead	0.12	-0.03 to 0.26	-0.01	-0.19 to 0.17	-0.04	-0.17 to 0.09	0.08	-0.09 to 0.25
Iron	0.05	-0.10 to 0.20	-0.02	-0.20 to 0.16	-0.03	-0.12 to 0.07	-0.06	-0.24 to 0.12
Multivariable regression*								
PM ₁₀	0.27 ^a	0.13 to 0.40	0.01	-0.17 to 0.20	0.00	-0.12 to 0.12	0.03	-0.13 to 0.19
PM ₁	0.23 ^b	0.09 to 0.38	0.02	-0.17 to 0.21	-0.06	-0.16 to 0.05	0.04	-0.14 to 0.21
Aluminium	0.14	0.00 to 0.29	0.00	-0.19 to 0.18	0.05	-0.06 to 0.17	0.05	-0.11 to 0.21
Manganese	0.12	-0.03 to 0.26	-0.03	-0.22 to 0.15	-0.02	-0.15 to 0.12	0.12	-0.04 to 0.28
Nickel	0.08	-0.08 to 0.23	0.00	-0.18 to 0.19	0.04	-0.06 to 0.13	-0.03	-0.19 to 0.13
Zinc	0.08	-0.07 to 0.23	0.19 ^c	0.02 to 0.37	-0.07	-0.16 to 0.03	-0.21 ^c	-0.37 to -0.05
Arsenic	0.02	-0.14 to 0.18	-0.01	-0.20 to 0.18	0.04	-0.07 to 0.14	-0.04	-0.21 to 0.13
Lead	0.12	-0.02 to 0.27	-0.01	-0.19 to 0.18	-0.05	-0.18 to 0.09	0.08	-0.08 to 0.24
Iron	0.05	-0.10 to 0.21	-0.01	-0.20 to 0.17	-0.04	-0.13 to 0.06	-0.08	-0.25 to 0.09

Tabella 2: Associazione fra PM e sua componente metallica con la metilazione di quattro geni soppressori del tumore misurati nei campioni di post-esposizione.

3.3.1 Discussione Progetto 3:

Nel presente studio, abbiamo dimostrato che i livelli di metilazione media dei siti CpG del promotore erano significativamente associati con l'esposizione al PM e ad alcune componenti metalliche. In particolare, la media dei livelli di metilazione del DNA dei siti CpG misurata nei promotori APC o p16 aumentava significativamente nei campioni di DNA post-esposizione. Al contrario, la metilazione media nei siti CpG del promotore dei geni p53 o RASSF1A diminuiva nei campioni di DNA post-esposizione. L'analisi CpG sito-specifica non ha mostrato variazioni consistenti nei *pattern* di metilazione del DNA in due dei quattro geni. Recenti evidenze scientifiche in soggetti umani stabiliscono associazioni di alterazioni nella metilazione del DNA con esposizioni ambientali. Tali variazioni di metilazione possono persistere nel tempo anche in assenza delle condizioni che le hanno causate e possono addirittura accumularsi in risposta a esposizione continua^{32 33}. L'esposizione all'inquinamento atmosferico, in particolare per il PM, è stato associato ad un aumentato del rischio del tumore polmonare³⁴. La metilazione aberrante del DNA del promotore di geni soppressori del tumore, tra cui l'ipermetilazione di p16³⁵, APC³⁶ e RASSF1A³⁷, e

³² Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK: *Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility*. Science 2005, 308:1466-1469.

³³ Dolinoy DC, Weidman JR, Jirtle RL: *Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease*. Reprod Toxicol 2007, 23:297-307.

³⁴ Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K: *Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations*. Carcinogenesis 2005, 26:1846-1855.

³⁵ Suga Y, Miyajima K, Oikawa T, Maeda J, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Uchida O, Tsuboi M, Hirano T, et al: *Quantitative p16 and ESR1 methylation in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer*. Oncol Rep 2008, 20:1137-1142.

³⁶ Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, Jeronimo C, Harden S, Engles J, Danenberg PV, Yang S, Sidransky D: *Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer*. Cancer Res 2002, 62:371-375.

³⁷ Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, Nishii K, Matsuo K, Hotta K, Kozuki T, Aoe M, Kiura K, Ueoka H, Tanimoto M: *Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer*. Clin Cancer Res 2005, 11:1219-1225.

l'ipometilazione del p53³⁸, è stata osservata nel DNA dei leucociti di sangue periferico (*peripheral blood leukocytes*, PBL) in pazienti affetti da tumore polmonare, suggerendo che la metilazione del DNA nei PBL può servire come biomarcatore correlato al cancro. I quattro geni di interesse nel nostro studio sono coinvolti nel controllo del ciclo cellulare (p16), invasione e metastasi (APC), apoptosi (p53) e segnale Ras (RASSF1A) e hanno mostrato alterazioni nel DNA da sangue periferico di pazienti affetti da cancro ai polmoni. Alcuni dei nostri risultati sono in accordo con dati presenti in letteratura. Zhang et al e Chanda et al. hanno trovato ipermetilazione del gene onco-soppressore p16 nel DNA da sangue periferico di individui esposti a emissioni da utilizzo al chiuso di stufe a carbone non ventilate e di individui esposti ad alto livello di arsenico. È stato dimostrato che l'espressione di p16, uno dei primi e più promettenti marcatori epigenetici per la diagnosi del tumore al polmone, è regolata dalla metilazione del suo promotore³⁹. L'ipermetilazione di p16 è stata rilevata nei DNA dei PBL di fumatori non affetti da tumore, fumatori con il cancro ai polmoni e nel tessuto polmonare di ratti esposti a scarico di motori a diesel. L'ipermetilazione nel promotore APC, un altro evento precoce della tumori genesi, è stata ampiamente studiata nei tumori del polmone⁴⁰. L'ipermetilazione del promotore di APC è stato osservato anche nel tessuto polmonare in soggetti sani esposti al fumo di sigaretta e nel

³⁸ Woodson K, Mason J, Choi SW, Hartman T, Tangrea J, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D: *Hypomethylation of p53 in peripheral blood DNA is associated with the development of lung cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001, 10:69-74.

³⁹ Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB: *Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers*. *Cancer Res* 1995, 55:4525-4530.

⁴⁰ Belinsky SA, Snow SS, Nikula KJ, Finch GL, Tellez CS, Palmisano WA: *Aberrant CpG island methylation of the p16(INK4a) and estrogen receptor genes in rat lung tumors induced by particulate carcinogens*. *Carcinogenesis* 2002, 23:335-339.

sangue di pazienti affetti da tumore polmonare⁴¹. I nostri risultati mostrano per la prima volta che l'inquinamento dell'aria può indurre ipermetilazione del promotore APC in PBL. p53 è un fattore chiave nel *pathway* di segnalazione del danno al DNA e l'ipometilazione p53 è associata con la rottura a doppio filamento del DNA e con instabilità cromosomiche. In un precedente studio sull'uomo, abbiamo osservato ipometilazione di p53 in DNA da sangue periferico in lavoratori di fonderia polacchi di sesso maschile non fumatori esposti a idrocarburi policiclici aromatici (PAHs), paragonabile a quanto trovato in soggetti affetti da tumore polmonare. I nostri risultati suggeriscono quindi che l'ipometilazione di p53 nei PBL può anche essere rilevata in soggetti sani esposti a PM. Nonostante l'ipermetilazione del promotore di RASSF1A sia frequentemente osservata nel DNA da sangue periferico di pazienti con tumore polmonare, noi abbiamo trovato un'associazione inversa tra la metilazione media del promotore di RASS1FA e l'esposizione a PM. E' possibile che i nostri risultati rappresentino effetti tessuto-specifici dell'esposizione a PM sui leucociti del sangue periferico, così come falsi positivi dovuti alla limitata numerosità del campione in esame. Diversi geni oncosoppressori possono comportarsi diversamente rispetto alla cancerogenesi. L'inquinamento dell'aria può causare ipo o ipermetilazione in ciascun singolo gene a seconda del ruolo del gene nello sviluppo del tumore. Nel nostro studio abbiamo osservato un'associazione positiva della metilazione di p16 con lo zinco ed una associazione negativa della metilazione di RASSF1A con lo zinco in entrambe i modelli di regressione aggiustato e non. Lo zinco è una delle maggiori componenti del PM nelle acciaierie ed era presente ad elevati livelli nel PM misurato nel nostro studio. In studi su animali, si è visto che l'inalazione di zinco induce infiammazione e stress ossidativo.

⁴¹ Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, Jeronimo C, Harden S, Engles J, Danenberg PV, Yang S, Sidransky D: *Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer*. Cancer Res 2002, 62:371-375.

Kodavanti et al. hanno anche dimostrato che zinco rilasciabile da PM, induce modificazioni sistemiche e polmonari in diversi studi tossicologici in vivo. In oltre uno studio ha mostrato che l'inalazione di solfato di zinco solubile, anche a bassi livelli ($10 \mu\text{g}/\text{m}^3$), causava modificazione di espressione genica nel tessuto cardiaco in ratti sani. Il PM e le sue componenti metalliche possono influenzare la metilazione del DNA attraverso diversi processi cellulari, inclusi stress ossidativo da formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e infiammazione sistemica/deficit immunitario, le due maggiori componenti dell'eziologia del tumore. E' stato dimostrato che questi processi cellulari sono indotti da esposizione a PM e associati con alterazione nei *pattern* di metilazione del DNA.

3.3.2 Conclusione Progetto 3:

In conclusione, abbiamo osservato ipermetilazione di p16 e APC e ipometilazione di RASSF1A e p53 in un gruppo di lavoratori di acciaieria sani esposti a maggiori livelli di PM rispetto alla popolazione generale. Lo studio di alterazioni nella metilazione del DNA di geni oncosoppressori in cellule facilmente ottenibili come i PBL può avere un ruolo importante nello sviluppo di biomarcatori per individuare alterazioni biologiche in soggetti esposti a PM. Questi risultati suggeriscono che tali alterazioni nella metilazione possono riflettere processi correlati alla insorgenza di tumore polmonare indotta da PM. Tuttavia, poiché il nostro studio non include tumore polmonare o altri *end-point* correlati a tumore, non possiamo fare inferenze sul significato biologico dei nostri risultati. Servono studi ulteriori su più ampie popolazioni per raggiungere solide conoscenze sul fatto che soggetti esposti a PM con tali alterazioni nella metilazione del DNA siano a rischio più elevato di tumore polmonare.

3.4 Limiti dello Studio

A causa del numero limitato di soggetti allo studio, è possibile che le associazioni osservate siano attribuibili al caso. Tuttavia, l'esposizione professionale e l'ambiente relativamente controllato di una fonderia forniscono un buon *setting* per valutare queste domande meccanicistiche limitando l'errore e i risultati casuali. Il nostro studio si è basato su soggetti impiegati in diverse aree di lavoro della stessa fabbrica e non comprende una popolazione di soggetti senza una specifica esposizione a sostanze inquinanti inalabili. Limitando la nostra indagine alle persone che lavorano nella stessa struttura abbiamo evitato potenziali problemi connessi alla selezione di controlli esterni che potrebbero differire dalla popolazione esposta, in termini di fattori socioeconomici e altre caratteristiche. Tuttavia, le differenze nei livelli di esposizione personale nel nostro gruppo di studio sono ampie. Ad esempio, il livello più basso di PM₁₀ osservato nella nostra popolazione allo studio (73.72 µg/m³) è leggermente superiore ai livelli misurati nella zona geografica in cui si trova l'impianto (medie annue ambientali dei livelli di PM₁₀ tra i 41 e 57 µg/m³ sono state registrate nel corso dell'anno di studio da diverse stazioni di monitoraggio ambientale nella zona di Brescia), mentre il livello massimo è stato 1220.17 µg/m³. I soggetti con la più alta esposizione ad arsenico e nickel avevano livelli di esposizione di 36 e 31 volte superiori, rispettivamente a quelli dei soggetti meno esposti. Anche se abbiamo basato il nostro studio su un gruppo di operai d'acciaieria con esposizioni media superiore a quella della popolazione generale, i livelli di esposizione ai metalli nel nostro studio erano tutti inferiori ai limiti di soglia comunemente accettata per ambienti industriali (Conferenza Americana degli Igienisti Industriali 2009). Poiché abbiamo determinato le differenze di esposizione all'interno della nostra popolazione allo studio per i diversi compiti di routine eseguiti da ciascuno dei

soggetti, i livelli di esposizione personale che abbiamo misurato nella settimana dello studio riflettono l'esposizione abituale dei soggetti. La conferma è data dall'elevata correlazione ($r^2 > 0.90$) tra le misure di esposizione ripetute in 3 anni in un sottoinsieme della popolazione allo studio. I registri dello stabilimento hanno mostrato che tutti i soggetti inclusi nel presente studio hanno eseguito gli stessi compiti per tutti gli anni in cui sono stati impiegati nello stabilimento, suggerendo che le differenze di esposizione all'interno della popolazione in studio potrebbero rimanere stabili nel tempo. Pertanto, abbiamo stimato una esposizione cumulativa a lungo-termini intesa come il prodotto dei livelli di esposizione per gli anni di lavoro nello stabilimento. Tuttavia, poiché la maggior parte dei soggetti dello studio avevano lavorato per oltre un decennio nella fabbrica, è possibile che si siano verificate variazioni nelle normative riguardanti la tutela o l'esposizione. Riconosciamo che l'esposizione cumulativa stimata e utilizzata in questo studio è incline a misclassificazioni dell'esposizione e i risultati sulla base di questi parametri devono essere interpretati con cautela.

Bibliografia

- ✓ Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK: *Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility*. Science 2005, 308:1466-1469.
- ✓ Baccarelli A, Bollati V, *Epigenetics and environmental chemicals*; Curr Opin Pediatr. 2009 Apr;21(2):243-51.
- ✓ Bateson TF, Schwartz J, *Who is sensitive to the effects of particulate air pollution on mortality? A case-crossover analysis of effect modifiers*; Epidemiology, 2004 Mar;15(2):143-9.
- ✓ Belinsky SA, Snow SS, Nikula KJ, Finch GL, Tellez CS, Palmisano WA: *Aberrant CpG island methylation of the p16(INK4a) and estrogen receptor genes in rat lung tumors induced by particulate carcinogens*. Carcinogenesis 2002, 23:335-339.
- ✓ 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.
- ✓ Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, et al. 2004. *Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association*. Circulation 109:2655–2671
- ✓ Bruce Alberts; Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Capitolo 4: DNA, cromosomi e genomi in Biologia molecolare della cellula*, 5a ed., Bologna, Zanichelli [novembre 1984], marzo 2009. ISBN 978-88-08-20185-0
- ✓ Brunekreef B, Holgate ST, *Air pollution and health*; Lancet. 2002 Oct 19; 360(9341):1233-42.
- ✓ Cong YS, Wright WE, Shay JW, *Human telomerase and its regulation*; Microbiol Mol Biol Rev. 2002 Sep;66(3):407-25, table of contents.
- ✓ Dessain SK, Yu H, Reddel RR, Beijersbergen RL, Weinberg RA. 2000. *Methylation of the human telomerase gene CpG island*. Cancer Res 60:537–541
- ✓ Dolinoy DC, Weidman JR, Jirtle RL: *Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease*. Reprod Toxicol 2007, 23:297-307.

- ✓ Donaldson K, Stone V, Borm PJ, Jimenez LA, Gilmour PS, Schins RP, Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM, MacNee W, *Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM₁₀)*; Free Radic Biol Med. 2003 Jun 1;34(11):1369-82.
- ✓ Dye JA, Lehmann JR, McGee JK, Winsett DW, Ledbetter AD, Everitt JI, Ghio AJ, Costa DL, *Acute pulmonary toxicity of particulate matter filter extracts in rats: coherence with epidemiologic studies in Utah Valley residents*; Environ Health Perspect. 2001 Jun;109 Suppl 3:395-403.
- ✓ Feinberg AP, Tycko B, *The history of cancer epigenetics*; Nat Rev Cancer. 2004 Feb;4(2):143-53.
- ✓ Fujiwara K, Fujimoto N, Tabata M, Nishii K, Matsuo K, Hotta K, Kozuki T, Aoe M, Kiura K, Ueoka H, Tanimoto M: *Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer*. Clin Cancer Res 2005, 11:1219-1225.
- ✓ Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T, *The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation*; J Biol Chem. 2003 Feb 7;278(6):4035-40. Epub 2002 Nov 9.
- ✓ Ghio AJ, Devlin RB, *Inflammatory lung injury after bronchial instillation of air pollution particles*; Am J Respir Crit Care Med. 2001 Aug 15;164(4):704-8.
- ✓ Gilmour PS, Rahman I, Donaldson K, MacNee W, *Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003 Mar;284(3):L533-40. Epub 2002 Nov 22.
- ✓ Grewal SI, Moazed D, *Heterochromatin and epigenetic control of gene expression*; Science. 2003 Aug 8;301(5634):798-802.
- ✓ Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, Sidransky D, Baylin SB: *Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers*. Cancer Res 1995, 55:4525-4530.
- ✓ Hodes RJ, Hathcock KS, Weng NP. 2002. *Telomeres in T and B cells*. Nat Rev Immunol 2:699–706
- ✓ Hoxha M, Dioni L, Bonzini M, Pesatori AC, Fustinoni S, Cavallo D, et al. 2009. *Association between leukocyte telomere shortening and exposure to traffic pollution: a cross-sectional study on traffic officers and indoor office workers*. Environ Health 8:41; doi:10.1186/1476-069X-8-41 [Online 21 September 2009].

- ✓ Kurkjian C, Kummar S, Murgo AJ, *DNA methylation: its role in cancer development and therapy*. *Curr Probl Cancer*. 2008 Sep-Oct;32(5):187-235.
- ✓ Liu K, Hodes RJ, Weng N. 2001. *Cutting edge: telomerase activation in human T lymphocytes does not require increase in telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein but is associated with hTERT phosphorylation and nuclear translocation*. *J Immunol* 166:4826–4830.
- ✓ MacNee W, Donaldson K, *Mechanism of lung injury caused by PM₁₀ and ultrafine particles with special reference to COPD*; *Eur Respir J Suppl*. 2003 May;40:47s-51s.
- ✓ McCracken J, Baccarelli A, Hoxha M, Dioni L, Coull B, Suh H, et al. 2010. *Annual ambient black carbon associated with shorter telomeres in elderly men: Veterans Administration Normative Aging Study*. *Environ Health Perspect* 118:1564–1570.
- ✓ Salnikow K, Zhitkovich A, *Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: nickel, arsenic, and chromium*; *Chem Res Toxicol*. 2008 Jan;21(1):28-44.
- ✓ Suga Y, Miyajima K, Oikawa T, Maeda J, Usuda J, Kajiwara N, Ohira T, Uchida O, Tsuboi M, Hirano T, et al: *Quantitative p16 and ESR1 methylation in the peripheral blood of patients with non-small cell lung cancer*. *Oncol Rep* 2008, 20:1137-1142.
- ✓ Sun H, Zhou X, Chen H, Li Q, Costa M, *Modulation of histone methylation and MLH1 gene silencing by hexavalent chromium*. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Jun 15;237(3):258-66.
- ✓ Suwa T, Hogg JC, Quinlan KB, Ohgami A, Vincent R, van Eeden SF. 2002. *Particulate air pollution induces progression of atherosclerosis*. *J Am Coll Cardiol* 39:935–942
- ✓ Tarantini L, Bonzini M, Apostoli P, Pegoraro V, Bollati V, Marinelli B, Cantone L, Rizzo G, Hou L, Schwartz J, Bertazzi PA, Baccarelli A, *Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation*; *Environ Health Perspect*. 2009 Feb;117(2):217-22.
- ✓ Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, Jeronimo C, Harden S, Engles J, Danenberg PV, Yang S, Sidransky D: *Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer*. *Cancer Res* 2002, 62:371-375.
- ✓ Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, Jeronimo C, Harden S, Engles J, Danenberg PV, Yang S, Sidransky D: *Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer*. *Cancer Res* 2002, 62:371-375.

- ✓ Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K: *Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations*. Carcinogenesis 2005, 26:1846-1855.
- ✓ Weng NP, Granger L, Hodes RJ. 1997. *Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation*. Proc Natl Acad Sci USA 94:10827–10832.
- ✓ Wolffe AP, Matzke MA, *Epigenetics: regulation through repression*; Science. 1999 Oct 15;286(5439):481-6.
- ✓ Woodson K, Mason J, Choi SW, Hartman T, Tangrea J, Virtamo J, Taylor PR, Albanes D: *Hypomethylation of p53 in peripheral blood DNA is associated with the development of lung cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001, 10:69-74.
- ✓ Wrobel K, Wrobel K, Caruso JA, *Epigenetics: an important challenge for ICP-MS in metallomics studies*; Anal Bioanal Chem. 2009 Jan;393(2):481-6.
- ✓ Yauk C, Polyzos A, Rowan-Carroll A, Somers CM, Godschalk RW, Van Schooten FJ, Berndt ML, Pogribny IP, Koturbash I, Williams A, Douglas GR, Kovalchuk O, *Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location*; Proc Natl Acad Sci USA. 2008 Jan 15;105(2):605-10.
- ✓ Zhou X, Li Q, Arita A, Sun H, Costa M. *Effects of nickel, chromate, and arsenite on histone 3 lysine methylation*; Toxicol Appl Pharmacol. 2009 Apr 1;236(1):78-84.