

SPES

STUDIO DI ESPOSIZIONE NELLA
POPOLAZIONE SUSCETTIBILE

PROTOCOLLO

Studio di Esposizione nella Popolazione Suscettibile

SPES

Promotore	Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZSM) Via Salute, 2 - 80055 Portici (Napoli) Tel. +390817865111 Fax. +390817763125
Centro Coordinatore	Istituto Nazionale dei Tumori, Fondazione “G. Pascale” Via M. Semmola 80131 - Napoli
Principal Investigator	Dr Maurizio Montella Struttura Semplice Dipartimentale di Epidemiologia Istituto Nazionale Tumori di Napoli

DICHIARAZIONE DI RISERVATEZZA

Le informazioni contenute in questo documento, soprattutto dati inediti, sono di proprietà del IZSM (o sotto il suo controllo), e quindi forniti in modo confidenziale a Lei in qualità di Sperimentatore, potenziale o consulente, per Sua revisione, per revisione di Suo personale o di un Comitato Etico Indipendente. Resta inteso che queste informazioni non devono essere divulgate a terzi senza autorizzazione scritta da parte di IZSM, se non nella misura necessaria per ottenere il consenso informato da parte di potenziali partecipanti allo studio.

SPONSOR SIGNATURE

Signature	Date

PRINCIPAL INVESTIGATOR

Signature	Date



Istituto Zooprofilattico
Sperimentale
del Mezzogiorno

Indice generale

1. Introduzione.....	10
2. Obiettivo	12
3. Disegno dello studio.....	13
4. Studio ambientale.....	14
5. Campionamento ed analisi statistica.....	22
6. Procedure operative e Gestione dei dati.....	24
7. Metodi Analitici.....	28
7.1 Biomarcatori di esposizione.....	29
7.2 Biomarcatori di effetto biologico.....	31
7.3 Biomarcatori di suscettibilità genetica.....	35
8. Aspetti etici.....	34
9. Aspetti organizzativi.....	37
10. Proprietà dei dati e modalità di pubblicazione	37
11. Collaborazioni e prospettive future	36
12. Referenze.....	39
Figure 1: Definizione aree ad alto, medio e basso impatto.....	17
Figure 2: Cluster area ad alto impatto.....	20
Figure 3: Cluster area a medio impatto.....	21
Figure 4: Cluster area a basso impatto.....	22

Lista delle Abbreviazioni

AHP	Analitic Hierarchy Process
ARPAC	Agenzia Regionale Per la Protezione Ambientale Della Campania
BM	Biomonitoraggio
CNR	Consiglio Nazionale delle Ricerche
CSC	Concentrazioni Soglia di Contaminazione
D.Lgs	Decreto Legislativo
DNA	Acido desossiribonucleico
DPS	Documento Programmatico per la Sicurezza
eCRF	electronic Case Report Form
ICPMS	Spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente
IPA	Idrocarburi Policiclici Aromatici
IRCCS	Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico
GCP	Good Clinical Practice
OCP	Pesticidi Organoclorurati
mRNA	RNA messaggero
PCB	Policlorobifenili
PHI	Protected Health Information
POP	Principali inquinanti organici persistenti
PM	Polveri ambientali

SIT	Piano Territoriale Regionale (SIT Regione Campania)
-----	---

Sinossi

Titolo dello studio	S P E S Studio di Esposizione nella Popolazione Suscettibile
Promotore	Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno (IZSM) Via Salute, 2 - 80055 Portici (Napoli) Tel. +390817865111 Fax. +390817763125
Centro Coordinatore (studio monocentrico)	Istituto Nazionale Tumori "Fondazione G. Pascale" Via Mariano Semmola, Napoli 80131
Introduzione e razionale	Da almeno tre decenni in Campania, vaste aree delle province di Napoli e Caserta sono state oggetto di una alacre attività illecita costituita da sversamenti incontrollati di rifiuti industriali e urbani di natura estremamente eterogenea avvenuti sia abbandonandoli in superficie che interrando in zone agricole. Il fenomeno della combustione incontrollata dei rifiuti ha dato origine all'espressione "Terra dei Fuochi". In quest'area, un gran numero di studi di monitoraggio sia su matrici ambientali che su organismi viventi ha mostrato livelli compatibile con quelli attesi da inquinanti collegati alla combustione dei rifiuti, quali diossine, composti diossino-simili e i policlorobifenili. Ciò ci ha portato a proporre uno studio innovativo sull'epigenetica e sui biomarkers. La pericolosità di un composto tossico è potenziata dalla sua persistenza e capacità di diffusione nell'ambiente, nonché dalla tendenza ad accumularsi progressivamente nei vari organismi dai primi gradini della catena alimentare fino all'uomo, quale è il caso ad esempio delle diossine e dei composti diossino-simili. Nel corso degli anni si è teorizzato che la modalità di esposizione più importante risulta essere quella alimentare, soprattutto quando l'alimentazione è basata più su prodotti di origine animale per un processo di

	bioaccumulo attraverso la catena alimentare. La complessità della patologia oncologica, la sua multifattorialità ed i risultati dei trend temporali rimandano a valutazioni più complesse ed articolate. I lavori pubblicati hanno alimentato una controversia epidemiologica provocate anche da facili semplificazioni, come ribadito dalle attività del Registro Tumori Asl Napoli 3 e dall'Istituto Nazionale dei Tumori di Napoli.. Nella maggior parte del territorio della regione Campania, è stata eseguita un'analisi delle variabili misurate per la ricerca di eventuali pattern spaziali riconducibili a particolari sorgenti di contaminazione (modelli geostatistici), tenendo conto dell'uso del suolo, dei flussi di traffico stradale, della presenza di attività industriali, della distribuzione dei siti di combustione illegale di rifiuti ed altre informazioni, al fine di identificare eventuali variabili esplicative (“predittori”) dei livelli di inquinamento ambientale. Per capire le nuove vulnerabilità ambientali ed alimentari non ci si può dunque solo affidare agli strumenti classici utilizzati sinora (analisi epidemiologica di eventi patologici maggiori quali cancro e malformazioni congenite, i cui tempi non sono compatibili con una urgente necessità di prevenzione), ma piuttosto ricorrere ai nuovi strumenti analitici che, identifichino e misurino in primis, biomarcatori prossimali (biomarkers), ed end-point iniziali e intermedi di malattia nei tessuti/fluidi biologici per identificare segni precoci di modificazione funzionale o strutturale prima che si manifesti il danno clinico e per valutare la suscettibilità individuale (polimorfismi genetici funzionali).
Obiettivi dello studio	Lo studio SPES è uno studio di biomonitoraggio condotto sulla popolazione residente in Campania, che si propone come endpoint primario : quantificare direttamente in un ampio campione di popolazione (4200 soggetti) l'effetto dell'esposizione ambientale tramite l'impiego di biomarcatori di esposizione, biomarcatori di effetto, e biomarcatori genetici di suscettibilità individuale (nesso di causa ambiente-salute). Obiettivo secondario è analizzare in un sotto-studio di 525 soggetti rispettivamente l'esposizione a tossici ambientali e la presenza di polimorfismi genetici coinvolti nel metabolismo di contaminanti ambientali
Definizione del campione ed elementi statistici	Lo studio prevede la definizione di 3 aree con differente livello di impatto ambientale (alto, medio e basso). In modo da garantire una adeguata potenza

	nel confronto tra aree è stato definito un rapporto a priori nel reclutamento per le diverse aree pari a 4:2:1 per le corrispondenti aree alto, medio e basso impatto. Inoltre, per ciascuna area di impatto sono stati definiti differenti cluster di esposizione e una numerosità pari a 200 soggetti per cluster. In modo da garantire il rapporto di reclutamento tra le differenti aree di impatto nelle aree a basso e medio impatto saranno reclutati 600 soggetti per livello (cluster) di esposizione. Il totale dei soggetti arruolati è pari a 4200 soggetti (2400, 1200, 600 rispettivamente nelle aree ad alto, medio e basso impatto). Nel sotto-studio su 525 soggetti sarà mantenuto il medesimo rapporto di arruolamento. Le numerosità sopra indicate hanno una potenza del 80%, considerando un livello di significatività del 5%, una variabile di esito continua di identificare una deviazione standard tra le medie calcolate per le tre differenti aree di impatto pari a 0.05 (ipotizzando una deviazione standard della variabile continua pari a 1). Nel sotto-studio di 525 soggetti, mantenendo invariate le ipotesi sopra indicate, la deviazione standard tra le medie calcolate per le tre differenti aree di impatto risulta pari a 0.14. Il campionamento adottato è un campionamento stratificato con selezione delle unità a probabilità costanti. Le variabili di stratificazione sono il comune di residenza, il sesso e l'età.. L'analisi statistica verterà su test parametrici e non-parametrici, univariati e multivariati.
Durata dello studio	Data prevista di inizio reclutamento: Agosto 2016. Data prevista del completamento dell'arruolamento: dicembre 2016. Data prevista per chiusura database dopo controllo di qualità: Gennaio 2017.

1. Introduzione

Da almeno tre decenni, vaste aree delle province di Napoli e Caserta della regione Campania sono state oggetto di una attività illecita costituita da sversamenti incontrollati di rifiuti industriali, urbani e tossici ed estremamente eterogenei (amianto, vernici, pellame, scarti dell'industria siderurgica, pneumatici, etc) come ribadito anche dal rapporto 2013 di Legambiente. L'abbandono di questi rifiuti, spesso dati alle fiamme per cancellarne le tracce, o il loro interrimento in zone agricole, hanno rappresentato una attività condotta in maniera sistematica in un vasto territorio. Tale modalità di smaltimento ha generato notevole allarme sociale per il rischio di diffusione di inquinanti persistenti nell'ambiente. Il fenomeno della combustione incontrollata dei rifiuti ha dato origine all'espressione "Terra dei Fuochi", ripresa dagli organi di stampa come pure richiamata nell'ambito di interventi legislativi ad hoc (legge 6/2014). In quest'area, un gran numero di studi di monitoraggio sia su matrici ambientali che su organismi viventi ha mostrato livelli compatibile con quelli attesi da inquinanti collegati alla combustione dei rifiuti, quali diossine, composti diossino-simili e i policlorobifenili [1 -6].

L'analisi dei trend temporali delle malattie, in particolare dei tumori, è di fondamentale importanza non solo per la descrizione in generale dello stato di salute della popolazione, ma ancor più per evidenziare le possibili correlazioni con criticità ambientali sviluppatesi nel corso degli anni. I trend temporali di mortalità oncologica in Campania nel periodo 1988 / 2010 sono "decrementi", non solo a livello regionale ma anche, in misura minore, nelle province di Napoli e Caserta, sebbene nelle suddette province per alcune neoplasie vi sia un scostamento dal dato nazionale e regionale con un eccesso di mortalità [7,8]; Per tale eccesso l'analisi dei fattori determinanti chiama in causa molti elementi, tra cui, anche, l'organizzazione e la governance del Sistema Sanitario Regionale e lo stile di vita.

I dati non provano, al momento, una emergenza oncologica regionale legata all'inquinamento ambientale, né un nesso di causalità tra esposizione della popolazione residente ad inquinanti derivanti da sorgenti puntiformi (es. discariche) o diffuse (es. traffico veicolare) ed aumentata incidenza di patologie tumorali, endocrine, cardiovascolari, polmonari[2,3,4,6].

La complessità della patologia oncologica, la sua multifattorialità ed i risultati dei trend temporali rimandano a valutazioni più complesse ed articolate. I lavori pubblicati hanno alimentato una controversia epidemiologica provocata anche da facili semplificazioni, come ribadito dalle attività del Registro Tumori Asl Napoli 3 e dall'Istituto Nazionale dei Tumori di Napoli. [7-9]

D'altronde, l'evidenza di un nesso di causa tra esposizione della popolazione ad inquinanti, ed effetti sulla salute, sebbene spesso dichiarata o paventata, è tuttavia ad oggi solo circostanziale, ma non provata. Ciò a causa della copresenza di vari e importanti fattori di confondimento (socio-economici, sanitari, fumo, dieta ecc.), dell'indeterminatezza delle conoscenze sulle effettive vie e modalità di esposizione umana nonché dei

tempi lunghi di sviluppo di malattie croniche, in particolare oncologiche. Per comprendere i danni da nuove esposizioni derivanti da danni all'ambiente ambientali e/o eccessi alimentari non ci si può affidare solo agli strumenti classici utilizzati sin'ora (analisi epidemiologica di eventi patologici maggiori quali cancro e malformazioni congenite, i cui tempi non sono compatibili con un'urgente necessità di prevenzione), ma piuttosto occorre ricorrere ai nuovi strumenti analitici che identifichino e misurino in primis biomarcatori prossimali (Biomarkers) ed end-point iniziali e intermedi di malattia nei tessuti/fluidi biologici, al fine di identificare segni precoci di modificazione funzionale o strutturale prima che si manifesti il danno clinico (meet in the middle concept), valutando così anche la suscettibilità individuale (polimorfismi genetici funzionali) [10-13]. Infatti la letteratura scientifica internazionale mostra che, oltre ai fattori intrinseci (genetici) e a quelli relativi alle condizioni socio-economiche e agli stili di vita, l'esposizione ad inquinanti ambientali è in grado di influenzare negativamente la morbilità e la mortalità di una popolazione. La capacità di un contaminante ambientale di produrre effetti sulla salute dell'uomo è collegata, oltre che alla sua tossicità intrinseca, alla sua persistenza e diffusibilità nell'ambiente, nonché alla sua tendenza ad accumularsi progressivamente nei vari organismi che fanno parte della catena alimentare[10,13]. A tal proposito, basti pensare alla pericolosità biologica delle diossine e dei composti diossino-simili, che permangono per anni nell'ambiente e nel grasso degli organismi viventi [1]. Per questa ragione, l'alimentazione è sicuramente una modalità di esposizione per l'uomo ai tossici ambientali molto importante, e in modo particolare nel caso dell'assunzione di prodotti di origine animale, in virtù del bioaccumulo dei contaminanti attraverso la catena alimentare.

2 Obiettivo

Nell'ambito del progetto "Campania Trasparente" è stato condotto da parte dell'IZSM in tutta la Regione Campania un importante programma di monitoraggio delle diverse matrici ambientali e biologiche quali l'acqua, il suolo, l'aria, i prodotti alimentari di origine animale e vegetale.

Lo studio ambientale realizzato sul territorio campano dal piano di monitoraggio Campania Trasparente svolto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, unitamente alle attività del Gruppo Interministeriale "*Task Force Terra dei Fuochi*", dell'ARPAC, delle Università e del CNR ha reso possibile la caratterizzazione delle fonti di potenziale contaminazione ambientale e la elaborazione di una mappa dettagliata della distribuzione spaziale dei contaminanti. Nella maggior parte del territorio della regione Campania, è stata eseguita un'analisi delle variabili misurate per la ricerca di eventuali *pattern* spaziali riconducibili a particolari sorgenti di contaminazione (modelli geostatistici), tenendo conto dell'uso del suolo, dei flussi di traffico stradale, della presenza di attività industriali, della distribuzione dei siti di combustione illegale di rifiuti ed altre informazioni, al fine di identificare eventuali variabili esplicative

(“predittori”) dei livelli di inquinamento ambientale. Come specificato in dettaglio nella sezione “Metodi”, questa analisi ha consentito di individuare nell’ambito di una vasta area del territorio campano comprendente più di 150 comuni differenti *clusters* territoriali corrispondenti a livelli omogenei di pressione ambientale, permettendo di effettuare un campionamento della popolazione stratificato in base a tale variabile.

Ad integrazione e sulla base dei risultati ottenuti in tale monitoraggio ambientale, lo studio SPES è uno studio di biomonitoraggio condotto sulla popolazione residente in Campania, che si propone come endpoint primario : quantificare direttamente in un ampio campione di popolazione (4200 soggetti) l’effetto dell’esposizione ambientale tramite l’impiego di biomarcatori di esposizione, biomarcatori di effetto, e biomarcatori genetici di suscettibilità individuale (nesso di causa ambiente-salute). Obiettivo secondario è analizzare in un sotto-studio di 525 soggetti rispettivamente l’esposizione a tossici ambientali e la presenza di polimorfismi genetici coinvolti nel metabolismo di contaminanti ambientali (esposizione e trasferimento contaminanti).

Sarà così definita una cartografia integrata del rischio di contaminazione ambientale a cui i cittadini siano esposti che fungerà da strumento fondamentale di riferimento per tutte le politiche di riduzione di impatto dell’ambiente sulla salute.

3. Disegno dello studio

La situazione ambientale dell’area riguardante la Terra dei Fuochi è peculiare e complessa: la presenza di siti contaminati, lo scarso stato qualitativo dei corpi idrici, le pratiche di smaltimento illegale dei rifiuti e la combustione incontrollata di sversamenti illeciti, rende molto difficoltosa l’identificazione della popolazione esposta oggetto dello studio. E’ verosimile che la popolazione residente nei comuni di tale area sia stata sottoposta, nel corso degli anni, ad un effetto combinato di diversi fattori di rischio: stile di vita (fumo, alimentazione squilibrata, ecc.), attività professionale e inquinamento delle diverse matrici ambientali. In tale popolazione, l’effetto combinato di tali fattori provoca un aumento della suscettibilità alle patologie cronico-degenerative. E’ riconosciuto, inoltre, come tale effetto combinato non abbia le stesse conseguenze sulle persone, anche se appartenenti al medesimo gruppo familiare, in quanto esiste una specifica risposta individuale (genetica) al danno. Alcuni individui, infatti, possiedono capacità di resistere ai danni subiti (come aberrazioni cromosomiche, mutazione geniche) più sviluppate rispetto ad altri, ovvero maggiori capacità di riparare i danni mediante riparazione del DNA, attività immunologica, ecc.

Individuare in una determinata popolazione sia biomarcatori di esposizione (contaminanti ambientali) che di danno/effetto (ossidativi, epigenetici, metabolomici, immunologici, ecc. ecc.), ci permetterà di valutare anche il ruolo di marcatori di suscettibilità/funzionali (in particolare mutazioni/polimorfismi in geni coinvolti nei meccanismi di riparazione del DNA, condizioni virologico-immunitarie) che integrati fra loro possono

dare una misura affidabile di rischio biologico per la salute.

Il disegno dello studio, con un *set* integrato di valutazioni su soggetti sani e residenti in aree (*cluster*) a diverso indice di pressione ambientale, rappresenta un innovativo metodo di individuazione di rischio biologico nell'ottica soprattutto dell'avvio di misure di prevenzione primaria per le popolazioni più esposte, che rappresenta anche uno degli obiettivi principali del progetto complessivo "Campania Trasparente".

In tale contesto, a integrazione del monitoraggio sulle matrici ambientali e animali già in corso, il progetto SPES propone uno studio di biomonitoraggio trasversale che, con un campionamento stratificato, concentrato verso le fasce giovanili (20-49), in un'ottica di prevenzione primaria, considera *in primis* la popolazione dei comuni della Terra dei Fuochi, in modo tale da individuare contaminanti ambientali nei liquidi biologici su cui eseguire successivamente approfondimenti con analisi omiche. Gli stessi test saranno effettuati sulla popolazione residente nei comuni a medio e basso indice di inquinamento.

La fascia di età presa in considerazione (20-49) permette di correlare meglio sia gli stili di vita sia l'esposizione ai rischi lavorativi, attività che nelle fasce di età più giovane e più anziane risulterebbero sotto stimate o sovrastimate. Inoltre la scelta di questa fascia di età garantisce una maggiore adesione al progetto e di poter effettuare un follow-up a lungo termine (possibilità di ripetere lo studio a 10 o 20 anni).

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

Il documento qui presentato divide il piano d'azione in due fasi:

1. Parte Ambientale, che determina e genera le variabili;
2. Parte Analitica, che riguarda il livello di analisi statistica e di implementazione del progetto.

4. Studio ambientale

Uno studio di esposizione non può prescindere dalla conoscenza del territorio, dalla valutazione delle sorgenti di contaminazione e dal riscontro analitico delle stesse. SPES è parte integrante dell'azione di sistema Campania Trasparente che tiene conto di un approccio globale delle diverse matrici ambientali. Al fine di realizzare il dimensionamento campionario e geografico del disegno di studio abbiamo confrontato diversi parametri per la determinazione delle aree di impatto e specifici cluster.

VALUTAZIONE COMPARATA DEL RISCHIO

Lo studio SPES, con l'obiettivo di valutare gli effetti sulla salute umana delle differenti fonti di

contaminazione, attraverso l'analisi della distribuzione spaziale delle sorgenti di contaminazione ^[57] e dei valori di concentrazione misurati nelle diverse matrici nell'ambito del Piano di Monitoraggio Integrato "Campania Trasparente", prevede un modello di **valutazione comparata del rischio** per l'individuazione di aree che presentano lo stesso Indice di rischio potenziale. Si tratta, in sintesi, di modelli a punteggio che consentono di creare un sistema di classificazione ordinale di aree geografiche in rapporto al grado di esposizione della popolazione. Tali modelli sono adatti allo screening, e la loro applicazione consente di selezionare, di delimitare e di accorpare aree territoriali che presentano uno stesso indice di rischio potenziale per la salute umana, in cluster. In ogni metodo di analisi relativa del rischio occorre tenere presente la componente approssimata e, in parte soggettiva, legata all'uso di indicatori sintetici dello stato di inquinamento, dei meccanismi di trasporto di sostanze potenzialmente pericolose e dei loro effetti sui bersagli recettori.

La valutazione comparata del rischio adottata nell'ambito del Progetto SPES prende in considerazione le seguenti tre categorie di fattori rilevanti:



Il **modello concettuale sopra proposto** è una schematizzazione del processo di contaminazione finalizzata all'individuazione di:

- **fonti** di potenziale contaminazione;
- **dati analitici** su matrici ambientali (suolo, acqua, aria) (vedi allegato E);
- **percorsi** di migrazione dalle sorgenti di contaminazione ai potenziali bersagli;
- **bersagli** della contaminazione.

La valutazione comparata del rischio sull'intero territorio regionale Campano è stata effettuata considerando diversi parametri, che possono essere facilmente quantificabili attraverso dati disponibili, e che forniscono una rappresentazione dei tre elementi tipici della valutazione di rischio ambientale: sorgente, percorso e bersaglio.

Sorgenti di contaminazione

Come già accennato il contesto allo studio è caratterizzato da una molteplicità di sorgenti di contaminazione, di vario tipo e dimensioni, talora a breve distanza l'una dall'altra, che producono impatti fortemente diversificati. In virtù di ciò, sorge la necessità di considerare, nell'approccio metodologico utilizzato, un ampio set di variabili (sorgenti di contaminazione) che consentano di definire aree a differente suscettibilità all'inquinamento. Le sorgenti di inquinamento sono state georeferenziate e ordinate all'interno di un database geografico nella forma di file vettoriali, costituiti da punti (es. discariche, impianti di gestione rifiuti, ecc.), linee (es. corpi idrici superficiali) e poligoni (es. corpi idrici sotterranei, uso del suolo, ecc.).

Le variabili prese in considerazione sono:

- Siti contaminati
- Zoning: uso del suolo e qualità dell'aria
- Aree di particolare interesse
- Stato qualitativo dei corpi idrici - Analisi acque
- Migrazione inquinanti – Analisi aria
- Potential Hazard - Analisi suolo
- Sversamenti illeciti di rifiuti e roghi
- Impianti gestione dei rifiuti: impianti di compostaggio, impianti di termovalorizzazione, impianti STIR, discariche controllate, ecc.
- Particelle Decreto TdF 2a, 2b e 5, 4 e 3 di classe A

Riportate per esteso nell'allegato E

DEFINIZIONE AREE DI IMPATTO

L'elaborazione dei dati e dei riscontri analitici ha consentito di definire le differenti pressioni ambientali esercitate sul territorio regionale. La distribuzione spaziale delle pressioni prodotte dalle diverse variabili ha fornito un'esauritiva rappresentazione del territorio, contraddistinta prevalentemente da tre livelli crescenti di impatti prodotti: alto impatto, medio impatto e basso impatto. Nel rispetto del principio di continuità spaziale e sulla base dei flussi di migrazione degli inquinanti è stata identificata, per ogni livello, un'area di intervento.

L'area ad **alto impatto** comprende una parte consistente di territorio delle province di Napoli e Caserta, estendendosi sulla piana del Volturno-Regi Lagni, la piana ad oriente di Napoli, Campi Flegrei, Somma Vesuvio e parte della piana del Sarno. Tale area è caratterizzata da zone fortemente antropizzate, uno scarso stato dei corpi idrici sotterranei e numerosi superamenti delle CSC dei campioni di suolo analizzati. Inoltre in riferimento a quest'area, si evince la presenza di numerosi siti potenzialmente contaminati o contaminati ai sensi del D. Lgs. 152/2006 che denota un elevato indice di pressione ambientale.

L'area a **medio impatto**, si estende sulle province di Napoli, Salerno ed Avellino, tra la piana del Sarno e la piana Solofra-Cavaiole, caratterizzate da uno scarso stato dei corpi idrici sotterranei e dal superamento di diverse CSC dei campioni di suolo analizzati. Inoltre, nei comuni avellinesi di Montoro e Solofra è stata riscontrata anche la presenza di composti alogenuri organici in falda, con concentrazioni molto elevate, superiori alle CSC.

L'area a **basso impatto**, ricadente prevalentemente nella provincia di Salerno, tra la zona costiera dell'Alento e l'area interna dell'alto Sele-Tanagro, è caratterizzata da un buono stato dei corpi idrici sotterranei, una bassa presenza di superamenti delle CSC nei suoli analizzati ed un basso tasso di antropizzazione.

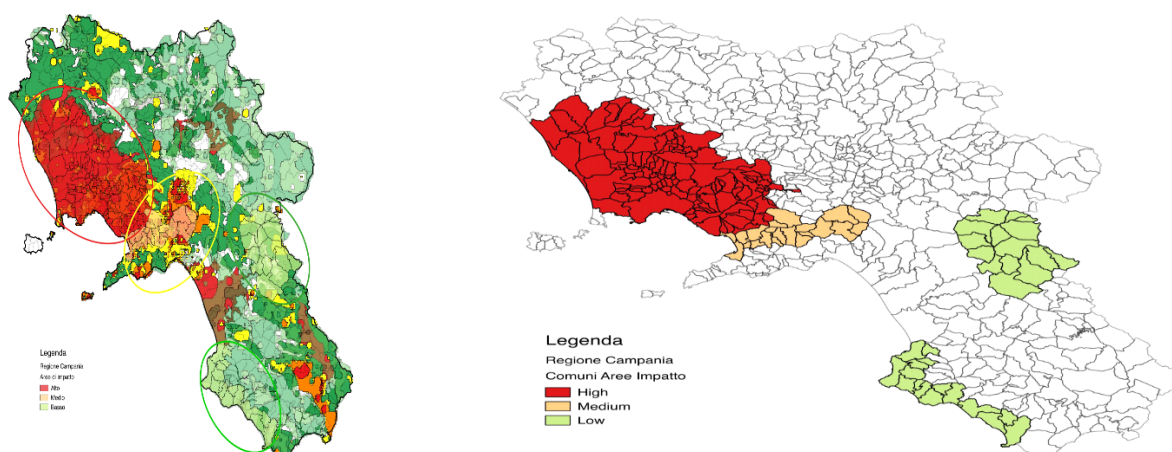


Figure 1: Definizione aree ad alto, medio e basso impatto

DEFINIZIONE DEI CLUSTER

L'indice di rischio comunale è stato ripartito in 15 intervalli secondo una classificazione di tipo natural break. Ognuno di questi intervalli rappresenta un cluster, costituito da un insieme di comuni. Di seguito si riportano gli intervalli definiti attraverso la metodologia adottata e i relativi cluster.

Cluster Alto Impatto

Nell'area ad alto impatto, comprendente 114 comuni tra le Province di Napoli e Caserta, sono stati individuati i 12 Cluster di seguito riportati, ottenuti mediante una disaggregazione degli indicatori calcolati dal processo di valutazione comparata del rischio:

Cluster	Mediana indice di rischio	Range
1	18	(15-19)
2	22	(20-23)
3	25	(23.1-26)
4	28	(27-29)
5	30	(30-32)
6	34	(32.1-36)
7	39	(37-39.9)
8	43	(40-44)
9	50	(47-51)
10	55	(53-58)
11	64	(63-65)
12	90	(80-99)

Nella fattispecie, le unità (114 comuni dell'area ad alto impatto) vengono inizialmente ripartite in un numero prestabilito di gruppi (12 nel nostro caso) e successivamente redistribuite in maniera diversa tramite un processo di minimizzazione della variabilità (varianza) all'interno di ogni gruppo e di massimizzazione della variabilità (varianza) tra i diversi gruppi. I gruppi così ottenuti non sono di uguale numerosità, ma rimangono omogenee al loro interno e disomogenee tra di loro. I limiti delle classi vengono posti dove vi siano salti

relativamente grandi nella distribuzione dei dati, in modo che all'interno della classe si abbiano valori il più simili possibile.

I 114 comuni interessati sono:

Acerra, Afragola, Arzano, Boscoreale, Boscotrecase, Brusciano, Caivano, Calvizzano, Camposano, Carbonara di Nola, Casalnuovo di Napoli, Casamarciano, Casandrino, Casavatore, Casoria, Castello di Cisterna, Cercola, Cicciano, Cimitile, Comiziano, Crispano, Ercolano, Frattamaggiore, Frattaminore, Giugliano in Campania, Grumo Nevano, Liveri, Marano di Napoli, Mariglianella, Marigliano, Massa di Somma, Melito di Napoli, Napoli, Nola, Ottaviano, Palma Campania, Poggiomarino, Pollena Trocchia, Pomigliano d'Arco, Portici, Pozzuoli, Qualiano, Quarto, Roccarainola, San Gennaro Vesuviano, San Giorgio a Cremano, San Giuseppe Vesuviano, San Paolo Bel Sito, San Sebastiano al Vesuvio, San Vitaliano, Sant'Anastasia, Sant'Antimo, Saviano, Scisciano, Somma Vesuviana, Striano, Terzigno, Torre del Greco, Trecase, Tufino, Villaricca, Visciano e Volla per la provincia di Napoli; Aversa, Calvi Risorta, Cancelli e Arnone, Capodrise, Capua, Carinaro, Carinola, Casagiove, Casal di Principe, Casaluce, Casapesenna, Casapulla, Caserta, Castelvoturno, Cesa, Curti, Falciano del Massico, Francolise, Frignano, Grazzanise, Gricignano d'Aversa, Lusciano, Macerata Campania, Maddaloni, Marcianise, Mondragone, Orta d'Atella, Parete, Pastorano, Pignataro Maggiore, Portico di Caserta, Recale, San Cipriano d'Aversa, San Felice a Cancelli, San Marcellino, San Marco Evangelista, San Nicola la Strada, San Prisco, San Tammaro, Sant'Arpino, Santa Maria Capua Vetere, Santa Maria la Fossa, Sparanise, Succivo, Teverola, Trentola Ducenta, Villa di Briano, Villa Literno e Vitulazio per la provincia di Caserta.

Cluster alto impatto

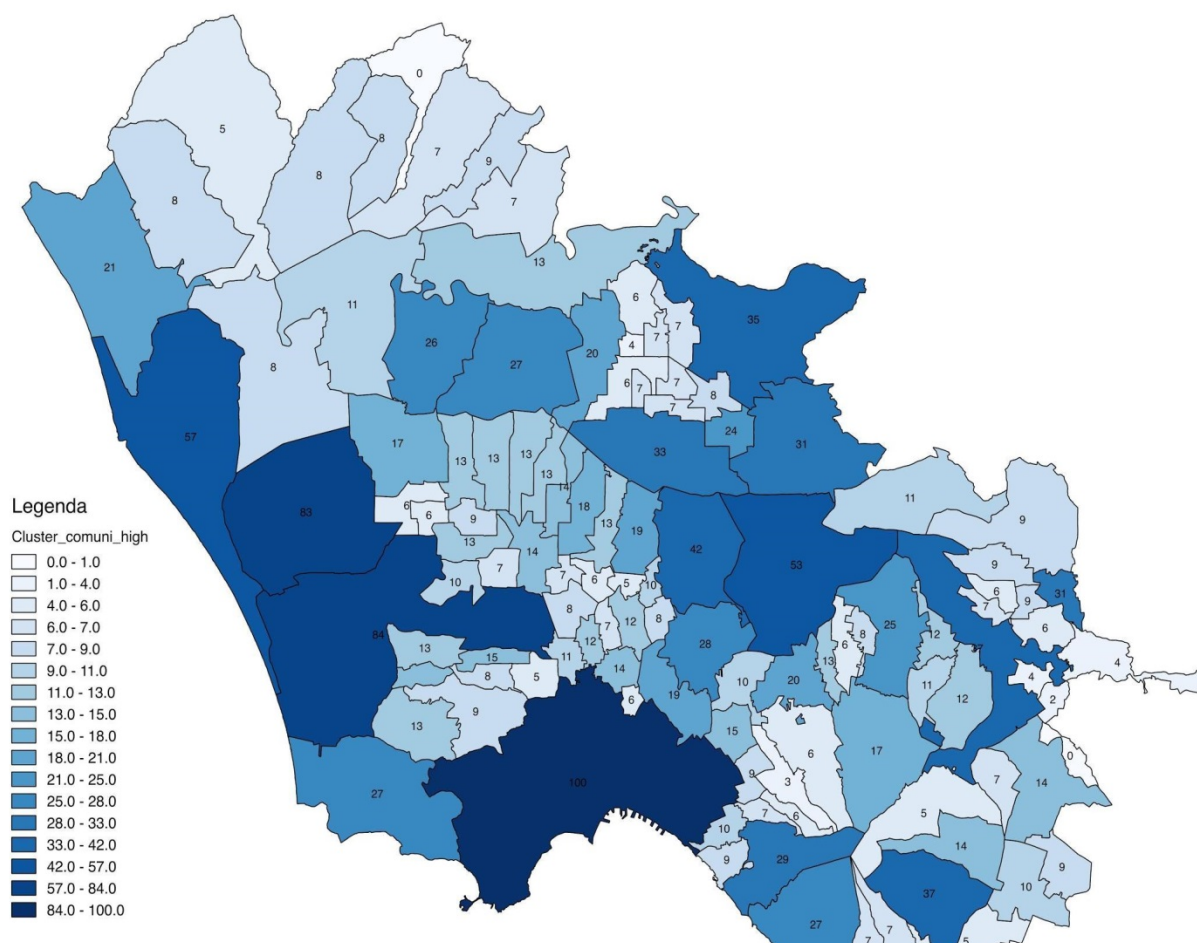


Figure 2: Cluster area ad alto impatto

Le unità (114 comuni dell'area ad alto impatto) vengono inizialmente ripartiti in un numero prestabilito di gruppi e successivamente ridistribuite in maniera diversa tramite un processo di minimizzazione della variabilità (varianza) all'interno di ogni gruppo e di massimizzazione della variabilità (varianza) tra i diversi gruppi. I gruppi così ottenuti non sono di uguale numerosità, ma rimangono omogenee al loro interno e disomogenee tra di loro.

Cluster medio Impatto

Nell'area a medio impatto sono stati definiti 2 cluster, comprendenti 23 comuni: Montoro e Solofra nella provincia di Avellino; Castellammare di Stabia, Pompei, Sant'Antonio Abate, Santa Maria La Carità e Torre Annunziata nella provincia di Napoli; Angri, Calvanico, Castel San Giorgio, Fisciano, Mercato Sanseverino, Nocera Inferiore, Nocera Superiore, Pagani, Roccapiemonte, San Marzano sul Sarno, San Valentino Torio, Sant'Egidio del Monte Albino, Sarno, Scafati e Siano nella provincia di Salerno.

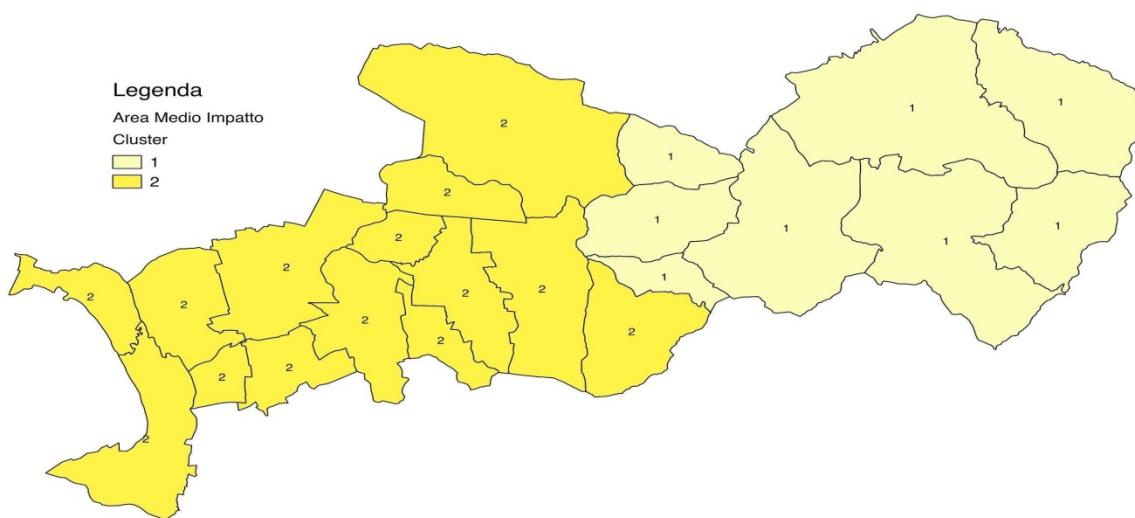


Figure 3: Cluster area a medio impatto

Cluster basso impatto

Nell'area a basso impatto, infine, è stato individuato un unico cluster in due aree territoriali con caratteristiche morfologiche differenti. In particolare sono stati presi in considerazione una parte dei comuni della fascia costiera a sud di Capaccio e una parte dei comuni delle aree interne nella zona dell'alto Sele-Tanagro per un totale di 31 comuni: Calabritto, Caposele e Senerchia ricadenti nella provincia di Avellino; Ascea, Buccino, Casal Velino, Castellabate, Castelnuovo di Conza, Centola, Colliano, Contursi Terme, Laureana Cilento, Laviano, Montecorice, Ogliastro Cilento, Oliveto Citra, Palomonte, Perdifumo, Pisciotta, Pollica, Ricigliano, San Gregorio Magno, San Mauro Cilento, San Mauro la Bruca, Santomenna, Serramezzana, Sicignano degli Alburni, Stella Cilento, Torchiara e Valva nella provincia di Salerno.

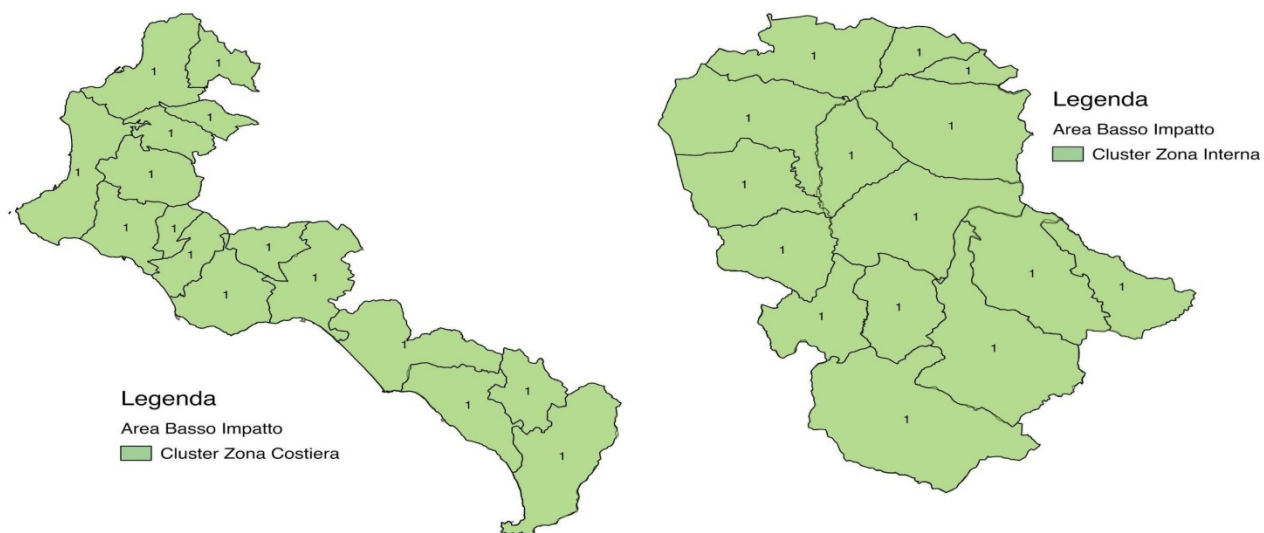


Figure 4: Cluster area a basso impatto.

5. Campionamento ed analisi statistica

Il metodo di campionamento è stato costruito partendo dal modello a punteggio di *valutazione comparata del rischio* che consente di creare un sistema di classificazione ordinale di aree geografiche costituite da aggregazioni di comuni (cluster) in rapporto al grado di esposizione della popolazione.

La popolazione target e il piano campionario

In base all' aggregazione dei comuni generata sono stati individuati 15 clusters distinti in tre gruppi 15 clusters distinti in tre gruppi: alto, medio e basso impatto rispettivamente con un rapporto di reclutamento a priori pari a 4:2:1, ciascuno dei quali individua uno specifico valore di rischio ambientale, pertanto la popolazione target è rappresentata dai residenti di ciascuna area/cluster, al fine di evidenziarne le differenze significative rispetto agli obiettivi di indagine.

Il piano di campionamento proposto è di tipo probabilistico, ossia ad ogni unità della popolazione è attribuita una probabilità di far parte del campione. In un campionamento probabilistico i risultati ottenuti dal campione potranno essere estesi, con un certo livello di fiducia (detto anche livello di confidenza), alla popolazione mediante la costruzione di opportuni stimatori ponderati.

Nello specifico, il disegno di campionamento adottato è un *campionamento stratificato con selezione delle*

unità a probabilità costanti (ogni unità statistica ha la stessa probabilità di entrare a far parte del campione).

Pur in assenza di regole assolute per la scelta delle variabili di stratificazione, alcune indicazioni tratte dalla letteratura appaiono particolarmente interessanti per la nostra indagine.

Gli strati generati devono essere omogenei al loro interno ed eterogenei tra di loro al fine di ottenere un miglioramento delle stime.

L'efficienza delle stime aumenta virtualmente con il numero di strati. Tuttavia, in linea di tendenza, dopo un certo numero di suddivisioni della popolazione, il beneficio in termini di efficienza è modesto. Si è cercato di combinare il numero di strati in modo da determinarne la numerosità ottimale.

L'efficienza del piano adottato è commisurata al grado di correlazione che presentano le variabili utilizzate per la stratificazione nei confronti della variabile oggetto di studio. Quanto più stretto è il legame tra le variabili di stratificazione e la variabile oggetto di indagine, tanto più efficace sarà la stratificazione.

Con il campionamento stratificato si persegue il miglioramento della precisione degli stimatori rispetto al campionamento casuale semplice, sfruttando la possibilità di campionare separatamente all'interno di diverse sottopopolazioni. Questa tipologia di campionamento presenta il vantaggio di sfruttare informazioni disponibili sulla popolazione; richiede, però, un lavoro preliminare consistente nella scelta delle variabili di stratificazione, nella determinazione del numero di strati, e della numerosità campionaria all'interno di essi.

Stratificazione a priori

Nel piano di campionamento proposto si è proceduto con una stratificazione effettuata in due fasi: stratificazione a priori con i cluster come variabili di stratificazione (15 gruppi definiti anche domini di studio) per i quali sono state ripartite le 4200 unità campionarie. La dimensione dei tre gruppi è stata determinata in base al rapporto 4 : 2 : 1 con N=2400 soggetti per l'alto impatto, N=1200 nel medio impatto e N=600 nel basso impatto.

Stratificazione a posteriori

I 15 cluster territoriali rappresentano anche i domini¹ di studio per i quali si vogliono effettuare le stime e poterne confrontare i risultati al fine di evidenziarne le differenze significative.

Con la stratificazione a posteriori, all'interno di ogni cluster le unità sono state allocate con tecnica proporzionale secondo le variabili "comune di residenza", "sesso" (maschi e femmine) ed "età" (classi di età decennali nella fascia 20 - 49) generando 6 sottogruppi. I comuni appartenenti al cluster non saranno messi a

1

Secondo la terminologia proposta da Kish (1987): "Si chiama dominio di studio ogni sottoinsieme di unità della popolazione per il quale si vogliono stimare uno o più parametri." In tal caso l'obiettivo è determinare i parametri distintamente per i 20 cluster per studiarne i diversi comportamenti.

confronto in quanto limitrofi sullo stesso territorio (cluster) e dunque omogenei per caratteristiche.

La dimensione del campione

Lo studio prevede la definizione di 3 aree con differente livello di impatto ambientale (alto, medio e basso). In modo da garantire una adeguata potenza nel confronto tra aree è stato definito un rapporto a priori nel reclutamento per le diverse aree pari a 4:2:1 per le corrispondenti aree alto, medio e basso impatto. Inoltre, per ciascuna area di impatto sono stati definiti differenti cluster di esposizione e una numerosità pari a 200 soggetti per cluster. In modo da garantire il rapporto di reclutamento tra le differenti aree di impatto nelle aree a basso e medio impatto saranno reclutati 600 soggetti per livello (cluster) di esposizione. Il totale dei soggetti arruolati è pari a 4200 soggetti (2400, 1200, 600 rispettivamente nelle aree ad alto, medio e basso impatto). Nel sotto-studio su 525 soggetti sarà mantenuto il medesimo rapporto di arruolamento. Le numerosità sopra indicate hanno una potenza del 80%, considerando un livello di significatività del 5%, una variabile di esito continua di identificare una deviazione standard tra le medie calcolate per le tre differenti aree di impatto pari a 0.05 (ipotizzando una deviazione standard della variabile continua pari a 1). Nel sotto-studio di 525 soggetti, mantenendo invariate le ipotesi sopra indicate, la deviazione standard tra le medie calcolate per le tre differenti aree di impatto risulta pari a 0.14. Il campionamento adottato è un campionamento stratificato con selezione delle unità a probabilità costanti. Le variabili di stratificazione sono il comune di residenza, il sesso e l'età..

L' *allocazione proporzionale* (utilizzata a posteriori) viene usata per ottenere un campione più rappresentativo di quanto non si otterrebbe con un campione casuale semplice o sistematico. Dopo aver effettuato la stratificazione degli elementi della popolazione secondo i caratteri che maggiormente influenzano il fenomeno che si intende studiare, si estrae da ogni strato una certa quantità di unità in proporzione alla numerosità dello strato, tale che: $n_1/N_1 = n_2/N_2 = \dots = n_k/N_k = n/N$ e cioè ogni strato contribuisce alla formazione del campione totale nella stessa misura in cui ogni sotto popolazione contribuisce a formare l'intera popolazione.

Per ottenere un campione stratificato proporzionale occorre, naturalmente, conoscere la parte di popolazione che afferisce ad ogni strato ed è possibile effettuare la stratificazione solo per quelle variabili di cui si hanno informazioni al momento del campionamento.

Potential selection bias

La mancata partecipazione dei soggetti individuati per la selezione, sia essa dovuta a rifiuto esplicito o a irreperibilità, rappresenta un problema nelle indagini statistiche in quanto può condurre a campioni nei quali i segmenti di popolazione meno disposti a collaborare (o meno raggiungibili) possono essere

sottorappresentati, producendo stime distorte (*selectivity bias*). Poiché nella stima si utilizzano solo le informazioni di coloro che hanno partecipato alla rilevazione, la distorsione cresce all'aumentare della mancata risposta e del divario tra il valore medio della variabile oggetto di studio per i rispondenti e per i non rispondenti.

Per limitare gli effetti della mancata partecipazione verranno adottate varie misure.

In primo luogo, gli individui che non sarà possibile intervistare saranno sostituiti con altri estratti con criteri casuali negli stessi comuni. Ciò consente di tenere sotto controllo una potenziale fonte di distorsione, cioè quella che origina dalla relazione tra territorio e caratteristiche dell'individuo.

In secondo luogo, al termine della rilevazione, verrà effettuata una stratificazione a posteriori sulla base di alcune caratteristiche individuali dei soggetti intervistati, che consentirà di riequilibrare, all'interno del campione, il peso dei diversi segmenti della popolazione. Essa verrà eseguita imponendo al campione finale, tramite tecniche di *raking*, l'allineamento alle caratteristiche della popolazione per quanto riguarda il sesso, la classe di età ed il cluster (basso, medio o alto impatto).

È tuttavia possibile che permarranno elementi di distorsione, cioè che a parità di quelle caratteristiche che sono tenute sotto controllo si continuino a selezionare con minore probabilità gruppi particolari di individui (ad esempio più o meno in salute). Questo aspetto non è facilmente valutabile poiché le informazioni relative ai non rispondenti non sono disponibili nell'indagine.

Il metodo di correzione si baserà necessariamente su una serie di ipotesi semplificatrici. In primo luogo l'ipotesi sarà che il meccanismo di mancata risposta sarà funzione delle sole caratteristiche osservabili (*missing at random*). In secondo luogo l'ipotesi sarà che la mancata risposta e gli errori di misurazione saranno fenomeni indipendenti. Di conseguenza, l'aggiustamento sarà realizzato al momento in modo indipendente dagli altri aggiustamenti.

6. Procedure operative e Gestione dei dati

I dati dello studio saranno raccolti dagli sperimentatori unicamente attraverso l'utilizzo di una scheda raccolta dati in formato elettronico elettronico (eCRF – web based) che sarà disponibile ad uno specifico indirizzo Internet. La eCRF lavorerà in accordo con le Good Clinical Practice (GCP) e i requisiti di legge in materia di sicurezza dei dati (differenziazione degli utenti, dei ruoli e dei loro privilegi, crittografia SSL a 128 bit, la de-identificazione delle Protected Health Information, l'auditing elettronico di ogni dato inserito e modificato e il monitoraggio attivo degli accessi degli utenti).

Per poter inserire i dati degli individui arruolati non è richiesta l'installazione di software particolari sui personal computer dei centri partecipanti; è sufficiente un personal computer e un collegamento ad Internet.

Ai singoli sperimentatori autorizzati alla registrazione dei dati clinici saranno forniti una UserID e una password (strettamente personale). Tale password dovrà essere modificata al primo accesso e successivamente ogni 3 mesi.

I dati degli individui arruolati non risiederanno sui personal computer degli sperimentatori ma al momento del loro inserimento verranno registrati in tempo reale sul server che ospita la eCRF.

I dati degli individui arruolati verranno trasferiti al server centrale in forma criptata utilizzando una tecnologia fondata sulla crittografia a 128 bit.

Modalità di selezione dei soggetti e reclutamento

Il reclutamento casuale dei soggetti, avverrà attraverso l'utilizzo di un apposito software dagli elenchi anagrafici forniti dai comuni nei quali sono stati individuati i cluster, rispettando i criteri di stratificazione definiti nella procedura di campionamento (età, sesso, cluster di residenza).

La procedura di arruolamento garantirà a tutti i residenti la stessa probabilità di essere reclutati nello studio raggiungendo così le condizioni necessarie per confrontare in modo attendibile e rigoroso i risultati tramite la valutazione statistica a posteriori.

L'arruolamento sarà effettuato secondo i seguenti criteri di inclusione:

- Soggetti di entrambi i sessi di età compresa tra i 20 e i 49 anni
 - Consenso del soggetto e firma consenso informato
 - Anamnesi negativa per infezione da HCV, HBV e HIV
 - Residenza nel comune di residenza al momento dell'inclusione da almeno 10 anni continuativi

Sarà disponibile 24h un call center per tutte le informazioni relative allo studio.

Procedure

Reclutamento

Sarà realizzata una specifica campagna di comunicazione per portare a conoscenza della popolazione residente nei cluster lo studio, con le modalità i rischi e tutti i particolari del progetto. Grazie al software verranno individuati 4200 soggetti e si procederà a contattarli attraverso posta ordinaria

Una volta selezionato il campione e ottenuto il consenso informato alla partecipazione allo studio, tutti i 4200 soggetti arruolati saranno sottoposti alle seguenti procedure:

Una volta ottenuto il consenso informato alla partecipazione allo studio, tutti i 4200 soggetti arruolati saranno sottoposti alle seguenti procedure:

1. Anamnesi
 - medica, con particolare attenzione anche alla familiarità per malattie tumorali
 - familiare
 - lavorativa
2. Visita ed esame obiettivo generale (Peso, Altezza, pressione arteriosa, saturazione, frequenza cardiaca)
3. Questionari sulle abitudini alimentari e sulle abitudini di vita (allegato B)
4. Prelievo di 20ml di sangue intero per le seguenti analisi
 - Esami biochimici generali per la valutazione dello stato di salute
 - Determinazione attività biologica diossino-simile tramite test CALUX
 - Quantificazione livelli metalli ed elementi in traccia

Criteri di esclusione: Tutti i campioni saranno sottoposti a verifica della carica virale per HCV, HBV e HIV, quale primo accertamento: i soggetti con diagnosi conclamata di HCV, HBV e HIV saranno esclusi dall'arruolamento in quanto la gestione di questi sieri implica trattamenti di sicurezza da parte degli operatori con percorsi di sanificazione e conservazione diversi dalle procedure standard

5. Prelievo di 85 ml di sangue intero da crio-conservare nella Bio-Banca Istituzionale (BBI) dell'Istituto Pascale. Tale materiale potrà essere utilizzato allo scopo di misurare i biomarcatori di esposizione, di effetto biologico precoce/suscettibilità genetica richiamati in questo protocollo. In alternativa, tali campioni potranno essere impiegati per ricercare/validare biomarcatori di esposizione, effetto biologico precoce, suscettibilità genetica nell'ambito di un protocollo di ricerca separato. La crioconservazione di tali campioni sarà possibile solo in seguito all' approvazione da parte del Direttore Scientifico dell'Istituto del relativo progetto e sarà coordinata direttamente dal Principal Investigator dello studio SPES, il quale si atterrà scrupolosamente alle procedure approvate con determinazione commissariale e richiamate nell'allegato C.

Un sottogruppo di 525 soggetti sarà arruolato, mantenendo invariate le ipotesi sopra indicate, la deviazione standard tra le medie calcolate per le tre differenti aree di impatto risulta pari a 0.14

- Marcatori di effetto biologico precoce
- Marcatori di suscettibilità genetica
- Analisi approfondita delle diossine e dei composti diossino-simili.

A questi stessi individui non sarà effettuato il prelievo per la biobanca, e sarà stato preventivamente richiesto di raccogliere un campione di feci per l'analisi microbiomica.

Nel processo operativo dello studio verranno coinvolte unità mobili con service medico specializzato (personale medico, infermieristico..), afferenti al Promotore (o incaricati da esso) responsabili della raccolta dati e dei campioni biologici in accordo a specifiche Procedure Operative Standard (SOP).

Il razionale dei biomarcatori analizzati nello studio SPES è descritto nei Metodi Analitici, mentre le modalità di prelievo del campione e le specifiche delle metodiche impiegate sono descritte in dettaglio nell'allegato A.

Analisi statistica dei dati

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

L'approccio metodologico per la gestione ed elaborazione della grande quantità di dati raccolti per lo studio SPES, in particolare dati metabolomici basati su spettri di NMR monodimensionali e bidimensionali avverrà attraverso l'analisi dei Big Data fondamentale nel decifrare le informazioni e identificare le correlazioni nascoste ed estrarre le informazioni significative.

7. Metodi Analitici

Metodi analitici

Oramai da tempo attraverso la biologia molecolare epigenetica in primis, ha mostrato le variazioni e sollecitazioni provenienti dall'ambiente che una volta recepite, elaborate e integrate a diversi livelli (recettori, via extracellulare ecc...) sono in grado di agire attraverso l'Epigenoma e una serie di proteine enzimatiche sul Dna inducendo a trasformazioni e modifiche la stessa sequenza Base del fenotipo.

In coerenza con gli obiettivi del progetto e con le partnership del gruppo di lavoro prenderemo in considerazione:

BIOMARCATORI DI ESPOSIZIONE	Concentrazione di uno xenobiotico, di un suo metabolita o del prodotto della loro interazione con un componente endogeno
BIOMARCATORI DI EFFETTO BIOLOGICO	Alterazioni biochimiche morfologiche o funzionali rilevabili nell'organismo umano
BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITA' GENETICA	Suscettibilità indice di predisposizione (ereditaria od acquisita) di un individuo a subire gli effetti di uno xenobiotico

7.1 Biomarcatori di esposizione

Biomarcatori di esposizione

Diossine e composti diossino-simili

Il termine diossina è comunemente usato per riferirsi ad una famiglia di sostanze chimiche tossiche strutturalmente correlate (congeneri), con un comune meccanismo tossicocinetico. Le diossine sono contaminanti ambientali che si formano come prodotti secondari nel processo di incenerimento dei rifiuti o in alcuni processi industriali. I composti della famiglia delle diossine sono oggetto frequente degli studi di monitoraggio ambientale e biologico collegato all'inquinamento per attività antropiche per tre motivazioni:

- si formano durante la fase iniziale della combustione dei rifiuti;
- sono carcinogeni riconosciuti;
- sono in grado di persistere nell'ambiente e negli organismi viventi per lunghissimo tempo (8).

Fra tutti i composti diossino-simili, la sostanza maggiormente nota per la sua cancerogenicità conclamata (IARC monographs) è la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-diossina nota più semplicemente come diossina o TCDD. L'uso indiscriminato di PCB (policlorobifenili), di PCB contaminati da diossine e la immissione incontrollata nell'ambiente di diossine hanno portato alla dispersione di queste sostanze in tutti i comparti ambientali. La presenza di diossine, PCB diossina-simili e non diossina simili (PCB "indicatori") negli alimenti è dovuta principalmente al bioaccumulo attraverso la catena alimentare. La principale fonte di esposizione per l'uomo a queste sostanze è rappresentata infatti dall'assunzione di prodotti alimentari di origine animale (EFSA, 2005, 2010) provenienti da produzioni zootecniche esposte ad emissioni di diossine e PCB che, principalmente per ricaduta dall'atmosfera, si depositano sulla superficie di suoli, foraggi, pascoli e acqua. Questo fenomeno determina nell'uomo l'esposizione continua a basse dosi che a lungo andare causa il bioaccumulo nei tessuti, provocando una serie di effetti avversi sulla salute che coinvolgono principalmente il sistema immunitario, lo sviluppo dell'organismo e la riproduzione, oltre alla

cancerogenicità conclamata. È accertato infatti che l'esposizione alle diossine predispone fortemente le cellule alla trasformazione neoplastica. Inoltre, un significativo incremento nell'incidenza di diabete è stato dimostrato in esseri umani con livelli di accumulo di diossina in un intervallo da 99 a 140 ng/kg p.v., attraverso un monitoraggio durato oltre 20 anni su veterani della guerra del Vietnam (USAF, 1996). Quale principale effetto a lungo termine di esposizione a basse dosi, invece, questi contaminanti hanno la capacità di interferire con il sistema endocrino, agendo come distruttori endocrini chimici(10). A questo proposito, la persistenza delle diossine e dei PCB è documentata anche nei tessuti umani, oltre che nelle matrici ambientali, con il conseguente rilascio graduale e l'esposizione cronica a basse dosi degli organi target. L'emivita della TCDD infatti, di circa 2-4 settimane in roditori, è stata stimata a 7-11 anni negli esseri umani, anche se con notevoli variazioni individuali[1]. Anche nel caso di una combustione regolata nell'ambito di impianti di incenerimento, l'impatto ambientale in termini di contaminazione da parte di diossine e i composti diossino-simili è rilevante(11). Nel caso peculiare della Terra dei Fuochi, la pratica diffusa di incenerimento incontrollato dei rifiuti rende i suoi abitanti a rischio di contaminazione da diossine e composti diossino-simili. Va notato che gli studi di monitoraggio ambientale e biologico condotti fino ad ora nella Terra dei Fuochi hanno mostrato alte concentrazioni di diossine (≥ 5.0 pg TEQ / g grasso) in campioni di latte provenienti da pecore, mucche, e bufali di fiume notevole contaminazione da diossina e PCB nei campioni di latte umano da coloro che vivono nelle zone di Napoli e Caserta (PCDD + PCDF e diossina-simili-PCB (dl-PCB) valutato a 16,6 pg TEQ / g di grasso; range: 7.5 -43 pg / g di grasso) (12). Non sono ancora ben noti i livelli di diossine nel sangue della popolazione campana, pertanto la stima dell'esposizione alle diossine non può prescindere dal biomonitoraggio, cioè dalla determinazione del carico corporeo individuale, attraverso la determinazione dei livelli di inquinanti nel siero del sangue, attualmente riconosciuto come il più potente strumento per determinare l'esposizione umana alle sostanze inquinanti persistenti, come le diossine e PCB.

Metalli pesanti

La contaminazione da elementi tossici è una criticità ambientale e di sicurezza alimentare globale. I metalli per i quali sono stati stabiliti dei limiti negli alimenti (piombo, cadmio e mercurio) appartengono al gruppo degli elementi non essenziali e tossici, per i quali non sono conosciute funzioni nei processi biologici. In questo gruppo, il mercurio è considerato l'elemento più pericoloso per l'ambiente e la salute umana, in particolare per quanto riguarda la sua capacità di biomagnificazione (13). Tra i metalli tossici con alcune funzioni biologiche, l'arsenico è molto diffuso nelle due forme diverse, organico e inorganico, e proprio in quest'ultima forma l'arsenico è stato classificato nel Gruppo A dei cancerogeni per l'uomo (US EPA, 1999). Per quanto riguarda il cromo, analogamente all'arsenico la tossicità per l'uomo è conclamata, in particolare del cromo VI che è stato incluso nel gruppo A dei cancerogeni per inalazione (US EPA 1998).

Numerose evidenze presenti in letteratura scientifica hanno dimostrato che nell'ambito della Terra dei Fuochi è presente una biocontaminazione dovuta a metalli pesanti (2;14;15). Per esempio, lo studio SEBIOREC[2] ha riscontrato un eccesso di livelli di arsenico nel siero dei residenti in alcune aree della provincia di Napoli (Brusciano, Caivano, Qualiano, Villaricca), mentre a Giugliano è stato riscontrato un eccesso di mercurio.

Questi dati, unitamente alla pericolosità dei metalli pesanti analizzati richiamata sopra, sono sufficienti perché questi siano inclusi tra le analisi di biomonitoraggio previste da SPES.

7.2 Biomarcatori di effetto biologico

Analisi epigenetica

L' epigenetica è lo studio dei meccanismi della regolazione dell'espressione genica che si verificano senza cambiamenti nella sequenza di DNA, meccanismi che includono la metilazione del DNA, la modificazione degli istoni e l'espressione di miRNA. Insieme, essi forniscono una base molecolare per determinare come l'ambiente influisca sul genoma in modo tale da modificare la suscettibilità alla malattia (16). In quest'ottica, lo studio SPES si propone di effettuare una approfondita analisi epigenetica, attraverso la valutazione della metilazione del DNA e del contenuto dei microRNA nei leucociti del sangue periferico di un sottogruppo di individui arruolati nell'ambito dello studio.

Il più noto meccanismo epigenetico è la metilazione del DNA, che è un parametro genomico flessibile che può cambiare la funzionalità del genoma sotto influenze esogene. La metilazione avviene fisiologicamente a livello delle citosine nelle sequenze CpG ed è coinvolta nel controllo della corretta espressione dei geni. In generale, l'aumento della metilazione è inversamente associato all' espressione genica. In situazioni patologiche si osservano una progressiva ipo-metilazione globale del genoma e una concomitante iper-metilazione a livello dei promotori di geni specifici (17). Una diminuzione del livello globale di metilazione del DNA può contribuire alla mobilizzazione di elementi trasponibili (ALU e LINE, ad esempio) che possono causare instabilità cromosomica, mentre l'ipermetilazione delle isole CpG dei promotori è coinvolta nel silenziamento di geni che svolgono spesso un ruolo nella regolazione della crescita cellulare, nel differenziamento, nella trasduzione del segnale e nella riparazione del DNA, o che sono implicati nelle metastasi e nell'angiogenesi tumorale. Gli stessi contaminanti tossici che sono misurati nello SPES sono in grado di modificare la metilazione del DNA(18). I metalli, per esempio, sono noti per la loro capacità di incrementare i livelli di stress ossidativo a livello cellulare. Il danno causato al DNA da tale aumento nei livelli di radicali liberi dell'ossigeno inficia severamente l'attività della metiltrasferasi (enzima deputato alla metilazione del DNA), risultando quindi in cambiamenti nei livelli della metilazione del DNA. Tale meccanismo è stato osservato in seguito ad esposizione a cadmio (19,20) e si è osservata anche una capacità inibitoria della metilazione nei proto-oncogeni da parte del cadmio, provocando una incontrollata

proliferazione cellulare. Anche l'arsenico gioca un ruolo fondamentale nella carcinogenesi, agendo sulla metilazione del DNA (come dimostrato in uno studio di popolazione in India: i soggetti esposti ad arsenico mostravano ipermetilazione dei geni P53 e P16, rispetto ai soggetti non esposti (21). Recentemente gli effetti tossici dell'arsenico sono stati associati anche a cambiamenti nell'espressione dei microRNA: i miRNA alterati sono coinvolti nel metabolismo del carbonio(22). Vi sono poi vari studi che dimostrano come il Nichel sia coinvolto nella tumorigenesi e nelle patologie cardiovascolari agendo non solo sulla metilazione del DNA[16] ma anche a livello istonico(24). È stato osservato un ruolo preponderante del cromo nell'insorgenza del tumore al polmone, anche se i meccanismi epigenetici coinvolti sono ancora poco conosciuti. In un lavoro di Kondo et al. è stato dimostrato un ruolo del cromo nell'ipermetilazione del gene P16, misurata in tessuti tumorali polmonari e comparata con tessuti sani(25). Per quanto riguarda gli inquinanti dell'aria, il particolato atmosferico gioca un ruolo di rilievo: è stato infatti associato a patologie cardiorespiratorie e ad un aumento del rischio di sviluppare un tumore polmonare(26-30). Un'esposizione a lungo termine al PM₁₀ (PM composto da particelle di diametro inferiore ai 10 µm) è associata a una diminuzione nei livelli della metilazione globale (stimata attraverso gli elementi ripetuti altamente conservati Alu e LINE)[24]. L'esposizione al benzene è stata associata ad un aumentato rischio di sviluppare la leucemia mieloide acuta, come emerso da uno studio condotto su lavoratori esposti a benzene (benzinai e vigili urbani)(17): in questo lavoro si osserva una riduzione significativa nei livelli di metilazione globale in seguito ad esposizione al benzene. Il secondo meccanismo di controllo post-trascrizionale che verrà analizzato nell'ambito dello studio SPES è rappresentato dall'espressione dei microRNA (miRNA). I miRNA sono corte molecole di RNA (circa 22 nt) altamente conservate, non codificanti, che regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale. I miRNA sopprimono la sintesi proteica inibendo la traduzione di proteine o promuovendo la degradazione del mRNA, in entrambi i casi silenziando l'espressione genica. Una volta che i miRNA sono espressi, la loro maturazione è mediata dalle due endonucleasi Dicer e Drosha. Il miRNA maturo viene incorporato nel RNA-induced silencing complex (RISC), che dirige il miRNA a livello del mRNA target per la repressione traduzionale o la degradazione[25]. Anche i miRNA possono alterare l'espressione di geni in risposta ad esposizioni ambientali, quali ad esempio i metalli, e rappresentare un meccanismo patogenetico che lega l'esposizione alla insorgenza della patologia (33). Il fumo di sigaretta, come osservato in diversi studi (34-37), è ad oggi il fattore principale in grado di modificare l'espressione dei miRNA nell'uomo. Anche il particolato atmosferico gioca un ruolo chiave, come evidenziato nello studio di Bollati et al. (2010) in cui si osservano variazioni nell'espressione di tre diversi miRNA analizzati in una popolazione di lavoratori di un'acciaieria(38); in particolare uno di questi tre miRNA risulta maggiormente espresso in seguito ad un aumento dei livelli di esposizione e di conseguenza anche di stress ossidativo.

Analisi telomerica

L'accorciamento telomerico è in grado di identificare i danni precoci al DNA e rappresenta un meccanismo rilevante alla base dello sviluppo di un cancro e altre patologie cronico-degenerative. Da un punto di vista molecolare, la riduzione della lunghezza telomerica può aumentare l'instabilità genomica, facilitando l'accumulo di aberrazioni cromosomiche e promuovendo la tumorigenesi, oppure provocare senescenza o apoptosi, fenomeni legati all'invecchiamento cellulare. La lunghezza del telomero viene considerata un indicatore dell'età biologica dal momento che diminuisce (fisiologicamente) con l'età, ma numerosi fattori, tra i quali lo stress-ossidativo, l'infiammazione ed alterazioni del metabolismo, sono stati associati ad un maggiore e patologico accorciamento dei telomeri e invecchiamento cellulare precoce(39). Ricerche recenti hanno anche dimostrato che gli insulti provocati dall'inquinamento ambientale, possono portare all'accorciamento dei telomeri (40). In particolare, è stata osservata una significativa diminuzione della lunghezza dei telomeri in leucociti di un gruppo di vigili urbani, esposti ad elevati livelli di inquinanti del traffico e nei quali sono risultate concentrazioni ematiche maggiori di benzene e toluene, rispetto ad gruppo di impiegati in ufficio. In un altro studio caso-controllo di autisti di camion e macchinari pesanti esposti ad alti livelli di inquinanti PM , gli autori hanno dimostrato che un'esposizione a breve termine può causare un aumento della lunghezza dei telomeri nei leucociti, al contrario un'esposizione a lungo termine può causare la riduzione telomerica attraverso lo stress ossidativo indotto da PM a cui la struttura ricca in G (guanina) dei telomeri è più sensibile di quanto sia nelle altre regioni di DNA genomico (41). In studio recente ha anche riportato una significativa riduzione dei telomeri nel sangue di un campione di 50 donne residenti in prossimità di discariche abusive (area nord-est di Napoli) rispetto a quelli relativi ai campioni prelevati da 50 donne di controllo che vivevano in un'area vicina (Avellino) e libera da discariche (42). Inoltre, la valutazione dell'accorciamento dei telomeri ha dato risultati di grande interesse nello studio SEpiAs (Sorveglianza epidemiologica in aree interessate da inquinamento ambientale da arsenico di origine naturale o antropica) coordinato da IFC-CNR.

Infine, anche esposizioni occupazionali, quali dosi medio-basse di fumi di saldatura e radiazioni ionizzanti si sono rivelate in grado di portare ad un accorciamento della lunghezza telomerica (43).

I risultati di questi studi indicano che la misura dei telomeri può essere estremamente utile nell'identificare possibili effetti biologici precoci, svolgendo un ruolo chiave nei meccanismi molecolari che, innescati dall'esposizione, conducono alla malattia.

Stress ossidativo

L'omeostasi dello stato RedOx è un prerequisito fondamentale per il mantenimento dello stato di salute. Infatti, la sua alterazione è in grado di modificare numerosi meccanismi fisiologici e la insorgenza di uno stato di stress ossidativo è alla base dell'insorgenza di numerose patologie. E' noto che gli inquinanti atmosferici esercitano un effetto tossico attraverso la loro capacità di produrre elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS), con conseguente produzione di stress ossidativo. Uno dei principali meccanismi alla

base della tossicità degli inquinanti ambientali è dovuta alla capacità di alcuni di questi di produrre elevati livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS), con conseguente produzione di stress ossidativo. In uno studio condotto su 39 guidatori di taxi esposti al traffico veicolare (44) è stato dimostrato in questi una diminuzione dei livelli di enzimi anti-ossidanti e un aumento dei markers di stress ossidativo (come ox-LDL), rispetto al gruppo di controllo non esposto. In uno studio condotto in Repubblica Ceca, l'inquinamento atmosferico era associato a markers di stress ossidativo quale l'ossidazione proteica e la perossidazione lipidica (45). In relazione a queste e altre evidenze (46) che legano gli indici di stress ossidativo all'evento-malattia da una parte e all'esposizione a tossici ambientali dall'altra, lo studio SPES includerà una valutazione approfondita dello stato REDOX misurato sul sangue della popolazione arruolata. In tale contesto, il monitoraggio degli effetti dell'esposizione a inquinanti ambientali sullo stato RedOx si pone l'obiettivo di fornire una base di dati di valori di riferimento affidabile per conoscere i potenziali effetti nocivi sulla salute (47).

Stato immunitario e analisi metabolomica

Un gran numero di studi ha collegato l'esposizione a inquinanti ambientali con alterazioni del livello di citochine nel siero, conseguente alle interferenze degli xenobiotici con il sistema immunitario e all'effetto pro-infiammatorio di questi ultimi. Un gran numero di studi ha collegato l'esposizione a inquinanti ambientali con alterazioni del livello di citochine nel siero, conseguente alle interferenze degli xenobiotici con il sistema immunitario e all'effetto pro-infiammatorio di questi ultimi. Dati in vitro mostrano come inquinanti ambientali siano dotati della capacità biologica di inquinanti di alterare la secrezione di citochine in linea cellulari (48). Questi dati sono coerenti con le esperienze nell'uomo. Per esempio, analizzando i livelli di linfociti T produttori IL-4 e IFN-gamma nei neonati, Lehmann e altri hanno mostrato che questi erano rispettivamente aumentati e diminuiti dall'esposizione delle madri a fonti di naftalene e di tricloroetilene, rispettivamente (49). Una correlazione tra esposizione ad inquinanti tossici e livelli di citochine è stata trovata analizzando i livelli di queste ultime nelle lacrime di soggetti esposti (50). Assieme ai marcatori di stato immunitario, sarà anche effettuata una analisi innovativa delle perturbazioni metabolomiche riscontrate negli individui valutati, sulla scorta dei dati raccolti circa i livelli sierici di metaboliti in lavoratori esposti a TCDD in confronto a lavoratori non esposti. Uno studio ha dimostrato una variazione nei lavoratori esposti dei livelli di metaboliti implicati nei pathways relativi all'accumulo lipidico, beta-ossidazione degli acidi grassi ed al metabolismo degli amminoacidi (51).

Analisi microbiomica

Il microbioma umano è l'insieme dei genomi dei simbionti microbici che l'organismo umano ospita e che all'interno di quest'ultimo svolgono una serie di funzioni di grande rilevanza fisiologica. Tra 1 e 2 kg di batteri vivono nell'intestino umano, mentre altri abitano altre superfici del corpo. Le cellule microbiche sono 100 volte più numerose delle cellule umane e ci sono 100 geni microbici per ogni gene umano (52,53).

Il microbiota intestinale è solitamente valutato attraverso l'analisi delle feci ed è oggi la componente più

studiata del microbioma umano perché guida molteplici funzioni metaboliche per l'ospite ed è stato associato allo sviluppo di molti tipi di malattie, come aterosclerosi, malattie infiammatorie croniche dell'intestino, diabete, obesità (54-56). L'ambiente e lo stile di vita hanno grande influenza nella definizione della struttura del microbioma intestinale. Le abitudini alimentari e/o fluttuazioni nella dieta possono indurre cambiamenti rapidi e riproducibili nel microbioma intestinale (57) e possono pertanto avere un ruolo nel mantenimento dell'omeostasi o portare ad uno stato di disbiosi. Fattori ambientali come l'insediamento umano, il livello di urbanizzazione e le condizioni di lavoro possono influenzare direttamente o indirettamente il microbioma umano. Nel concetto di co-evoluzione tra gli esseri umani ed il loro microbioma è certo che i microbi possono stabilire una sorta di adattamento a ciò a cui il corpo umano è esposto. Questo è il motivo per cui si trovano microbiomi diversi in individui sani di diversa etnia (58) o da ambienti diversi (59).

La valutazione del microbioma umano nell'ambito dello studio SPES ha lo scopo di valutarne il possibile legame con i contaminanti ambientali. Dati preliminari indicano l'esistenza di un effetto dell'inquinamento dell'aria sul microbioma (60) e un possibile coinvolgimento dei microrganismi nel metabolismo delle sostanze inquinanti con possibile influenza sulla tossicità per l'ospite (61). Data l'acclarata correlazione tra microbioma e salute, è di notevole importanza verificare se in popolazioni esposte ad elevato rischio ambientale si selezionano un particolare tipo di microbioma o si riscontrano uno specifico stadio di disbiosi.

7.3 Biomarcatori di suscettibilità genetica

E' ben noto che esiste una grande variabilità nella risposta individuale all'esposizione ai cancerogeni e ciò potrebbe avere un impatto sul rischio di sviluppare patologie collegate all'inquinamento ambientale. Alla base di tale suscettibilità individuale vi è la presenza di polimorfismi genetici in geni chiave coinvolti nei meccanismi di riparo del danno al DNA e nel metabolismo degli xenobiotici (62). In particolare, i polimorfismi di geni codificanti per gli enzimi CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 e GSTT1 sono stati associati a una maggiore suscettibilità individuale alle esposizioni ad idrocarburi policiclici aromatici e metalli pesanti. (63). Sulla base di tali presupposti, un sottogruppo di individui arruolati nello studio SPES sarà sottoposto ad approfondimento con valutazione dei polimorfismi suddetti, e la loro correlazione con i livelli di contaminanti ambientali identificati.

8. Aspetti etici

Protezione dei partecipanti e riservatezza dei dati personali

Lo studio è di tipo interventistico non farmacologico. Il protocollo è stato redatto in conformità alle Norme di Buona Pratica Clinica dell'Unione Europea in materia di studi interventistici e alla revisione corrente della

Dichiarazione di Helsinki.

Il protocollo e i suoi allegati sono soggetti a revisione e approvazione del Comitato Etico del Centro coordinatore. Lo studio sarà notificato al Comitato Etico di ciascun centro partecipante in accordo con la normativa italiana vigente e sarà avviato solo in seguito al ricevimento di autorizzazione da parte dell'ospedale (dove prevista).

Tutti i record che identificano il soggetto resteranno confidenziali e, con i limiti permessi dalle leggi vigenti, non saranno resi disponibili al pubblico. Un numero identificato sequenziale sarà attribuito in maniera automatica dal software ad ogni soggetto inserito nello studio. Questo numero identificherà il soggetto e dovrà essere incluso in tutte le schede di raccolta dati. Lo sperimentatore manterrà presso il centro un log book dove - per evitare errori di identificazione - verranno riportate accanto ad un codice progressivo riconducibile all'identificativo soggetto registrato nel database, anche le iniziali e la data di nascita del soggetto.

Ogni e tutte le informazioni del soggetto o la documentazione riguardante lo studio clinico, sono soggette ai provvedimenti delle leggi di protezione dei dati personali (Dl.vo n°196/2003). Esse saranno identificabili soltanto dagli sperimentatori autorizzati presso ciascun centro.

Non sono identificabili rischi fisici, psichici e/o sociali direttamente derivati dalle procedure che saranno seguite per l'arruolamento degli individui arruolati nello studio e la raccolta dei relativi dati.

Gestione del consenso informato

Tutti i soggetti saranno informati degli scopi dello studio, della sua natura dello studio e dell'assenza di procedure diagnostiche e terapeutiche diverse dalla pratica clinica corrente, della volontarietà alla partecipazione e della possibilità di rifiutare l'ulteriore partecipazione allo studio in ogni momento senza che questo pregiudichi le cure successive. L'osservazione verrà pertanto sospesa in caso di ritiro del consenso da parte del soggetto.

Tutti i soggetti saranno informati della confidenzialità dei dati personali, e del fatto che questi dati potranno essere sottoposti a revisione, per motivi legati allo studio, da parte di individui autorizzati diversi dal medico. Il soggetto prenderà visione del foglio informativo descrittivo delle caratteristiche dello studio, della nota informativa sulla protezione dei dati personali e potrà esprimere la volontà di aderire allo studio firmando il modulo di consenso al trattamento.

Il modulo di consenso informato scritto sarà firmato e datato personalmente dal soggetto. Verrà ottenuto il consenso informato al trattamento dei dati personali per tutti i soggetti prima della loro registrazione nel

database dello studio, in conformità con le normative nazionali e locali.

9. Aspetti organizzativi

La durata dell'arruolamento sarà di 6 mesi. Le attività previste per l'esecuzione del protocollo saranno svolte sotto il coordinamento scientifico del Principal Investigator, o direttamente presso l'Istituto Pascale o, visto il gran numero di individui da arruolare e il tempo di arruolamento breve, presso strutture sanitarie pubbliche e/o private appositamente convenzionate dal Promotore e/o presidi mobili appositamente messi a disposizione dal Promotore. Il Promotore, sotto il coordinamento scientifico del Principal Investigator, avrà cura di allestire una centrale operativa incaricata del coordinamento di tutte le attività logistiche, mediche e non mediche, necessarie per l'esecuzione del protocollo, rispetto alle quali saranno elaborate procedure operative standard per la gestione dei processi. Tale centrale operativa sarà inoltre responsabile dell'elaborazione, trasmissione e gestione in sicurezza dei dati personali e sensibili trattati.

Data prevista di inizio reclutamento: agosto 2016.

Data prevista del completamento dell'arruolamento: dicembre 2016.

Data prevista per chiusura database: dicembre 2016.

10. Proprietà dei dati e modalità di pubblicazione

Il promotore del presente studio, ovvero il IZSM, è il Titolare dei dati che ne derivano. Tutti i centri e i ricercatori che partecipano allo studio saranno a conoscenza di tale circostanza ed invitati a non diffondere le informazioni o dati senza previo esplicito consenso del IZSM. Gli sperimentatori di ciascun centro avranno sempre accesso alle informazioni degli individui da loro reclutati contenute nel data base.

La raccolta dei dati sarà coordinata dal Coordinatore dello studio. Le pubblicazioni risultanti dall'analisi dei dati raccolti in questo studio multicentrico saranno sotto la responsabilità del Promotore dello studio, sentito il parere del Principal Investigator.

11. Collaborazioni e prospettive future

Lo studio SPES è uno studio clinico di biomonitoraggio concepito e progettato con il fine di tracciare una mappa dettagliata della contaminazione ambientale del territorio campano, quale indispensabile completamento del progetto "Campania Trasparente". Esso impiega metodiche per la valutazione dell'esposizione ai contaminanti ambientali di comprovato valore scientifico e laboratori di elevata esperienza ed affidabilità; allo stesso tempo lo studio SPES esplora la fattibilità dell'applicazione nell'ambito

della popolazione generale di tecniche altamente sofisticate ed innovative in grado di intercettare il danno biologico precoce a livello genomico, immunitario e microbiomico, con la possibilità di valutarne in dettaglio la correlazione con gli insulti ambientali.

Lo studio SPES verrà condotto in un frangente sociale, politico, scientifico ed economico di grande sensibilità ed attenzione verso il rapporto tra l'ambiente e lo stato di salute. Grande attenzione è rivolta nei confronti delle abitudini alimentari dei cittadini coinvolti nello studio SPES, come sottolineato dall'impiego di un questionario assai dettagliato, che è quello impiegato nello studio "EPIC". L'analisi simultanea delle abitudini alimentari e dei marcatori di effetto biologico, unitamente a solide evidenze di letteratura circa l'effetto benefico di alcuni alimenti, pone le premesse per future sperimentazioni di natura alimentare / interventistica nell'ambito della popolazione. Al contempo, quantunque lo studio SPES sia da considerare quale uno studio di biomonitoraggio limitato nel tempo, il valore clinico/predittivo delle molteplici e complesse misurazioni effettuate in termini di misura dello stato reale di salute/invecchiamento precoce degli individui arruolati nell'ambito dello studio SPES potrà essere mostrato dal loro follow-up prospettico condotto in uno studio complementare e separato.

In conclusione, la progettazione dello studio SPES, concepito quale natura continuazione del progetto Campania Trasparente, ha beneficiato della collaborazione di numerosi gruppi di ricerca, interni ed esterni allo studio, che hanno lavorato in sinergia con il fine di produrre uno strumento di biomonitoraggio in grado di definire il grado di esposizione dell'uomo a tossici ambientali e attribuire a questo un significato preciso in termini di danno biologico, costituendo così le premesse per la quantificazione del danno "ambientale" alla salute e i possibili interventi (dietetici, comportamentali, socio-sanitari) per limitarlo.

12. Referenze

1. Steenland, K., et al., *Dioxin revisited: developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen*. Environ Health Perspect, 2004. **112**(13): p. 1265-8.
2. De Felip, E., et al., *Priority persistent contaminants in people dwelling in critical areas of Campania Region, Italy (SEBIOREC biomonitoring study)*. Sci Total Environ, 2014. **487**: p. 420-35.
3. Regione Campania et al. " *Studio epidemiologico sullo stato di salute e sui livelli di accumulo di contaminanti organici persistenti nel sangue e nel latte materno in gruppi di popolazione a differente rischio d'esposizione nella Regione Campania- SEBIOREC- Rapporto finale- Dicembre 2010* " (available on L'Espresso magazine's website: http://www.iss.it/binary/sebi/cont/SEBIOREC_Final_report_Dec_2010_human_rev_1.pdf, accessed 20 April 2016) De Felip et al, " *Priority persistent contaminants in people dwelling in critical areas of Campania Region, Italy (SEBIOREC biomonitoring study)*", Science of the Total Environment 487 (2014): 420-435.
4. WHO Regional Office for Europe et al. " *Trattamento dei rifiuti in Campania: impatto sulla salute umana. Studio Pilota: Sintesi dei risultati e indicazioni preliminari*" 1.
5. Fazzo L, et al. *Analisi dei cluster di mortalità in un'area con una diffusa presenza di siti di smaltimento di rifiuti urbani e pericolosi in Campania*". In: XXX Congresso AIE. 4-6 October 2006, Terrasini (Palermo):92; Fabrizio Minichilli et al, " *Rischio di malformazioni congenite nei comuni delle province di Napoli e Caserta* ". In: XXX Congresso AIE 4-6 October 2006, Terrasini (Palermo): 29.
6. Mazza, A., et al., *Illegal Dumping of Toxic Waste and Its Effect on Human Health in Campania, Italy*. Int J Environ Res Public Health, 2015. **12**(6): p. 6818-31.
7. Crispo A, Barba M, Malvezzi M, Ciliberto G, and Montella M.. *Mortality trend for liver cancer in a hyperendemic area of hepatitis C virus infection in southern Italy: join-point analysis and comparison with European and Italian data*. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2014. **26**(2): 245-246.
8. Crispo A, Barba M, Malvezzi M, Arpino G, Grimaldi M, Rosso T, Esposito E, Sergi D, Ciliberto G, Giordano A, Montella M. *Cancer mortality trends between 1988 and 2009 in the metropolitan area of Naples and Caserta, Southern Italy: Results from a joinpoint regression analysis*. Cancer Biol Ther; 2013. **14**(12): 1113-1122.
9. Cantoni R. *The waste crisis in Campania, South Italy: a historical perspective on an epidemiological controversy*. Endeavour, 2016. **40**: 102-113.
10. Wild C,. *The exposome: from concept to utility*. Int J. Epid, 2012. **41**: 24-32.
11. Vineis P,. *Exposomics: mathematics meets biology*. Mutagenesis, 2015. **30**(6) : 719-722.

12. Vineis P, Van Veldhoven K, Chadeau-Hyam M, Athersuch TJ. *Advancing the application of omics-based biomarkers in environmental epidemiology*. *Environ Mol Mutagen*, 2013. **54**(7) : 461-467.
13. White, S.S. and L.S. Birnbaum, *An overview of the effects of dioxins and dioxin-like compounds on vertebrates, as documented in human and ecological epidemiology*. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2009. **27**(4): p. 197-211.
14. Zaccaroni, A., et al., *Elements levels in dogs from "triangle of death" and different areas of Campania region (Italy)*. *Chemosphere*, 2014. **108**: p. 62-9.
15. Basile, A., et al., *Heavy metal deposition in the Italian "triangle of death" determined with the moss *Scorpiurum circinatum**. *Environ Pollut*, 2009. **157**(8-9): p. 2255-60.
16. Matouk, C.C. and P.A. Marsden, *Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression*. *Circ Res*, 2008. **102**(8): p. 873-87.
17. Bollati, V., et al., *Changes in DNA methylation patterns in subjects exposed to low-dose benzene*. *Cancer Res*, 2007. **67**(3): p. 876-80.
18. Baccarelli, A. and V. Bollati, *Epigenetics and environmental chemicals*. *Curr Opin Pediatr*, 2009. **21**(2): p. 243-51.
19. Huang, D., et al., *Global DNA hypomethylation, rather than reactive oxygen species (ROS), a potential facilitator of cadmium-stimulated K562 cell proliferation*. *Toxicol Lett*, 2008. **179**(1): p. 43-7.
20. Takiguchi, M., et al., *Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation*. *Exp Cell Res*, 2003. **286**(2): p. 355-65.
21. Chanda, S., et al., *DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy*. *Toxicol Sci*, 2006. **89**(2): p. 431-7.
22. Marsit, C.J., K. Eddy, and K.T. Kelsey, *MicroRNA responses to cellular stress*. *Cancer Res*, 2006. **66**(22): p. 10843-8.
23. Lee, Y.W., et al., *Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens*. *Mol Cell Biol*, 1995. **15**(5): p. 2547-57.
24. Ke, Q., et al., *Alterations of histone modifications and transgene silencing by nickel chloride*. *Carcinogenesis*, 2006. **27**(7): p. 1481-8.
25. Kondo, K., et al., *The reduced expression and aberrant methylation of p16(INK4a) in chromate workers with lung cancer*. *Lung Cancer*, 2006. **53**(3): p. 295-302.
26. Brook, R.D., et al., *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*, 2004. **109**(21): p. 2655-71.
27. Peters, A., *Particulate matter and heart disease: evidence from epidemiological studies*. *Toxicol*

- Appl Pharmacol, 2005. **207**(2 Suppl): p. 477-82.
28. Samet, J.M., et al., *Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994*. N Engl J Med, 2000. **343**(24): p. 1742-9.
 29. Vineis, P. and K. Husgafvel-Pursiainen, *Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations*. Carcinogenesis, 2005. **26**(11): p. 1846-55.
 30. Baccarelli, A., et al., *Exposure to particulate air pollution and risk of deep vein thrombosis*. Arch Intern Med, 2008. **168**(9): p. 920-7.
 31. Tarantini, L., et al., *Effects of particulate matter on genomic DNA methylation content and iNOS promoter methylation*. Environ Health Perspect, 2009. **117**(2): p. 217-22.
 32. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
 33. Motta, V., et al., *MicroRNAs are associated with blood-pressure effects of exposure to particulate matter: Results from a mediated moderation analysis*. Environ Res, 2016. **146**: p. 274-81.
 34. Spira, A., et al., *Effects of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10143-8.
 35. Izzotti, A., et al., *Relationships of microRNA expression in mouse lung with age and exposure to cigarette smoke and light*. FASEB J, 2009. **23**(9): p. 3243-50.
 36. Schembri, F., et al., *MicroRNAs as modulators of smoking-induced gene expression changes in human airway epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(7): p. 2319-24.
 37. Takahashi, K., et al., *Cigarette smoking substantially alters plasma microRNA profiles in healthy subjects*. Toxicol Appl Pharmacol, 2013. **272**(1): p. 154-60.
 38. Bollati, V., et al., *Exposure to metal-rich particulate matter modifies the expression of candidate microRNAs in peripheral blood leukocytes*. Environ Health Perspect, 2010. **118**(6): p. 763-8.
 39. Calado, R.T. and N.S. Young, *Telomere diseases*. N Engl J Med, 2009. **361**(24): p. 2353-65.
 40. Borghini, A., et al., *Arsenic exposure, genetic susceptibility and leukocyte telomere length in an Italian young adult population*. Mutagenesis, 2016.
 41. Hoxha, M., et al., *Association between leukocyte telomere shortening and exposure to traffic pollution: a cross-sectional study on traffic officers and indoor office workers*. Environ Health, 2009. **8**: p. 41.
 42. De Felice, B., et al., *Telomere shortening in women resident close to waste landfill sites*. Gene, 2012. **500**(1): p. 101-6.
 43. Li, H., et al., *Oxidative stress, telomere shortening, and DNA methylation in relation to low-to-moderate occupational exposure to welding fumes*. Environ Mol Mutagen, 2015. **56**(8): p. 684-93.
 44. Brucker, N., et al., *Biomarkers of occupational exposure to air pollution, inflammation and oxidative damage in taxi drivers*. Sci Total Environ, 2013. **463-464**: p. 884-93.

45. Rossner, P., Jr., et al., *Analysis of biomarkers in a Czech population exposed to heavy air pollution. Part II: chromosomal aberrations and oxidative stress*. Mutagenesis, 2013. **28**(1): p. 97-106.
46. Moller, P., et al., *Air pollution, oxidative damage to DNA, and carcinogenesis*. Cancer Lett, 2008. **266**(1): p. 84-97.
47. Osburn, W.O. and T.W. Kensler, *Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults*. Mutat Res, 2008. **659**(1-2): p. 31-9.
48. Manzano-Leon, N., et al., *TNFalpha and IL-6 Responses to Particulate Matter in Vitro: Variation According to PM Size, Season, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon and Soil Content*. Environ Health Perspect, 2016. **124**(4): p. 406-12.
49. Lehmann, I., et al., *The influence of maternal exposure to volatile organic compounds on the cytokine secretion profile of neonatal T cells*. Environ Toxicol, 2002. **17**(3): p. 203-10.
50. Matsuda, M., et al., *Lacrimal Cytokines Assessment in Subjects Exposed to Different Levels of Ambient Air Pollution in a Large Metropolitan Area*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0143131.
51. Saberi Hosnijeh, F., et al., *Serum metabolomic perturbations among workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)*. Environ Mol Mutagen, 2013. **54**(7): p. 558-65.
52. Qin, J., et al., *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing*. Nature, 2010. **464**(7285): p. 59-65.
53. Gill, S.R., et al., *Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome*. Science, 2006. **312**(5778): p. 1355-9.
54. Greenblum, S., P.J. Turnbaugh, and E. Borenstein, *Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(2): p. 594-9.
55. Koeth, R.A., et al., *Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis*. Nat Med, 2013. **19**(5): p. 576-85.
56. Qin, J., et al., *A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes*. Nature, 2012. **490**(7418): p. 55-60.
57. David, L.A., et al., *Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome*. Nature, 2014. **505**(7484): p. 559-63.
58. De Filippo, C., et al., *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14691-6.
59. Tyakht, A.V., et al., *Human gut microbiota community structures in urban and rural populations in Russia*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2469.
60. Salim, S.Y., G.G. Kaplan, and K.L. Madsen, *Air pollution effects on the gut microbiota: a link between exposure and inflammatory disease*. Gut Microbes, 2014. **5**(2): p. 215-9.
61. Claus, S.P., H. Guillou, and S. Ellero-Simatos, *The gut microbiota: a major player in the toxicity of*

- environmental pollutants?* Npj Biofilms And Microbiomes, 2016. **2**: p. 16003.
62. Perera, F.P., *Molecular epidemiology and prevention of cancer*. Environ Health Perspect, 1995. **103** Suppl 8: p. 233-6.
63. Cresci, M., et al., *Maternal and paternal environmental risk factors, metabolizing GSTM1 and GSTT1 polymorphisms, and congenital heart disease*. Am J Cardiol, 2011. **108**(11): p. 1625-31