

ESPOSIZIONI MULTIPLE AD AGENTI OTO/NEUROTOSSICI E RUMORE IN AMBITO OCCUPAZIONALE: I MICRORNA QUALI BIOMARCATORI INNOVATIVI DI EFFETTO EPIGENETICO

INTRODUZIONE

La perdita dell'udito rappresenta un fattore fortemente invalidante, sia per la salute fisica dell'individuo che per la comunicazione interpersonale, che interessa almeno il 6 - 8% della popolazione mondiale. Se nel

1985, soltanto 42 milioni di persone soffrivano di perdita dell'udito, le statistiche più recenti dimostrano invece un rapido aumento a 500 milioni di persone.

Le cause della perdita dell'udito sono dovute a diversi fattori, sia esogeni che endogeni. Tra questi è possibile annoverare le infezioni virali, i problemi di microcircolazione, le patologie autoimmunitarie, le mutazioni genetiche e, a seguire, la rottura della membrana del labirinto, le malformazioni congenite dell'orecchio, l'esposizione al rumore e ai farmaci, nonché alle sostanze ototossiche presenti negli ambienti di vita e di lavoro. La perdita uditiva che interessa il recettore uditivo vero e proprio, la coclea, prende il nome di ipoacusia neurosensoriale ovvero *Sensorineural Hearing Loss* (SNHL). L'esposizione a rumore è una delle possibili cause di ipoacusia neurosensoriale, denominata, in questo caso, *Noise Induced Hearing Loss* (NIHL). La perdita uditiva indotta da esposizione a rumore si va ad aggiungere, nei soggetti esposti, alla perdita uditiva causata fisiologicamente dai processi di invecchiamento, ovvero, *Age Related Hearing Loss* (ARHL). L'esposizione a rumore può esacerbare quelli che sarebbero gli effetti dei processi di invecchiamento ed esistono evidenze epidemiologiche che la perdita uditiva sia associata al declino cognitivo negli anziani. Gli agenti ototossici possono avere un effetto di perdita uditiva 'per sé' o, qualora presenti simultaneamente al rumore, ne possono amplificare gli effetti dannosi. Lo stress ossidativo è il meccanismo più accreditato nelle attuali teorie meccanicistiche che cercano di spiegare la perdita uditiva di diversa eziologia. Sono attualmente in corso ricerche volte all'identificazione di fattori antiossidanti che possano essere utili alla prevenzione e al trattamento di queste patologie che, colpendo cellule del tessuto nervoso, sono per lo più irreversibili. Il Laboratorio Interazioni sinergiche tra rischi ha tra gli obiettivi principali lo studio dell'esposizione al rumore, in combinazione o meno con altri fattori ototossici, in ambito lavorativo.

Recenti evidenze della letteratura scientifica dimostrano che l'effetto di un'esposizione mista non può essere descritto semplicemente come la somma degli effetti dei singoli agenti tossici, non essendo noti gli effetti di interazione che potrebbero manifestarsi sia a breve che a lungo termine.

Tale difficoltà è ancora più evidente quando le dosi relative all'esposizione al singolo agente potenzialmente

dannoso sono basse, anche molto inferiori a quelle che rappresentano i limiti di esposizione noti.

Il problema delle esposizioni multiple viene pertanto affrontato con un approccio multitasking, basato sul coinvolgimento trasversale di altri laboratori, ciascuno dei quali competente su specifici fattori di rischio per valutare l'esposizione dei lavoratori e identificare gli effetti sulla salute e sull'ambiente.

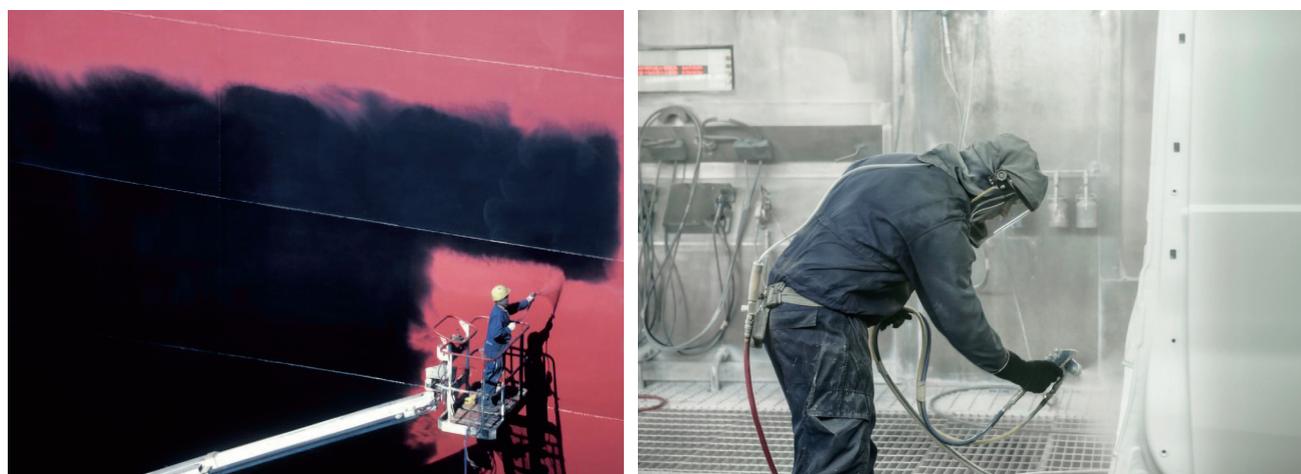
In ambito occupazionale, numerosi lavoratori appartenenti a diverse categorie sono esposti a miscele potenzialmente dannose (agenti inquinanti, sostanze tossiche e cancerogene) che devono essere eliminate attraverso il metabolismo con specifici meccanismi di detossificazione. Per poter valutare la dose assorbita vengono utilizzati dei biomarcatori specifici di dose, i.e. i principali metaboliti degli inquinanti stessi valutati in fluidi biologici. Nel caso dei metaboliti dei VOCs (Volatile Organic Compounds), il monitoraggio di tali biomarcatori consente di quantificare l'esposizione a solventi neuro e/o ototossici in termini di dose effettivamente assorbita e modulata dal metabolismo individuale. Ai biomarcatori di dose vengono aggiunti biomarcatori di effetto e di suscettibilità individuale al danno. I polimorfismi dei geni di detossificazione, ad esempio, costituiscono dei biomarcatori di suscettibilità individuale poiché hanno effetto sulla capacità individuale di eliminare metaboliti tossici. Tra i biomarcatori di effetto, vi sono gli indicatori di danno citotossico e genotossico, questi ultimi sono in grado di individuare il danno diretto al DNA e il danno da stress ossidativo. Altri, importanti indicatori di stress ossidativo misurano la concentrazione dei prodotti di degradazione del DNA e dell'RNA (basi ossidate degli acidi nucleici) nelle urine o in altri fluidi biologici. Questi ultimi biomarcatori si sono rivelati molto importanti nella valutazione del rischio da esposizione ad ototossici. Ai biomarcatori di effetto è stata affiancata una nuova classe di biomarcatori innovativi e prognostici, i microRNA, piccoli filamenti di acido ribonucleico, che potrebbero risultare utili ad identificare le alterazioni nella risposta fisiologica a inquinanti e agenti tossici, al fine di tutelare la salute dei lavoratori esposti. I microRNA sono acidi nucleici di piccole dimensioni (20 - 22 nucleotidi) non codificanti e a singolo filamento, altamente conservati in diverse specie, presenti in diversi fluidi biologici (sangue, urina, saliva, liquido seminale, liquido amniotico), facili da isolare dai campioni dei soggetti esposti, e responsabili della regolazione dell'espressione genica. L'alterazione dei livelli di espressione dei microRNA è coinvolta in numerosi processi cellulari quali regolazione, progressione, controllo del ciclo cellulare, apoptosi, processi infiammatori e sviluppo di diversi tipi di cancro. L'utilizzo di specifici biomarcatori epigenetici quali i microRNA risulta molto promettente nella diagnosi precoce di diverse patologie dei lavoratori (es. ipoacusia

occupazionale, patologie neurodegenerative). I microRNA permettono, inoltre, lo sviluppo di strategie preventive e di intervento sulla base di ipotesi meccanicistiche di insorgenza e sviluppo del danno. Lo studio dei meccanismi di risposta dei microRNA ai diversi stimoli ambientali potrebbe, infatti, permettere di comprendere meglio l'eziologia e lo sviluppo di diverse patologie e stabilire delle strategie di intervento precoce, in particolare, nel caso di scenari espositivi complessi come quello delle esposizioni occupazionali multiple. Nell'ambito dell'attività di ricerca il Laboratorio Interazioni sinergiche tra rischi, in collaborazione con altri laboratori del Dipartimento di medicina, epidemiologia, igiene del lavoro e ambientale (Dimeila), si occupa dello studio dei profili di espressione dei microRNA e dell'identificazione dei biomarcatori di stress ossidativo e danno al DNA in soggetti esposti ad agenti ototossici/neurotossici. In particolare sono stati effettuati studi preliminari per l'identificazione dei microRNA, differenzialmente espressi rispetto ai controlli, in lavoratori esposti ai VOCs, nello specifico solventi (etilbenzene, stirene, xilene, toluene) e ad altre

sostanze, come diluenti ed additivi, impiegati nell'attività di verniciatura nella cantieristica navale (Figura 1). Ulteriori ricerche condotte su alcuni microRNA hanno inoltre riguardato l'effetto sinergico dovuto alla co-esposizione a rumore e VOCs nell'indurre danni della funzionalità uditiva in relazione alla suscettibilità individuale dei lavoratori. Per valutare la funzionalità uditiva sono stati utilizzati l'audiometria tonale e il test delle emissioni otoacustiche (*Otoacoustic Emissions* OAEs). Queste ultime sono segnali acustici emessi come sottoprodotto dell'attività dei meccanismi di amplificazione del recettore uditivo, la coclea. Le emissioni otoacustiche vengono misurate nel condotto uditivo dopo aver eccitato il recettore uditivo con uno stimolo acustico. Nel caso delle emissioni otoacustiche da prodotto di distorsione (DPOAEs) vengono inviati due stimoli a 2 frequenze f_1 ed f_2 in un rapporto fisso. Poiché il recettore uditivo è un sistema non lineare, vengono generate delle risposte a frequenze diverse da quelle delle frequenze di stimolo. La più importante fra queste risposte è alla frequenza $2f_1 - f_2$, che è appunto nota come prodotto di distorsione.

Figura 1

Rappresentazione di alcune attività lavorative con potenziale esposizione ad agenti ototossici/neurotossici (VOCs)



(Inail - Dipartimento di medicina, epidemiologia, igiene del lavoro e ambientale)

RISULTATI

In due campagne sperimentali, la prima realizzata presso un cantiere navale a Viareggio, e la seconda in un cantiere navale di Ancona, sono stati esaminati lavoratori esposti nel settore della verniciatura e rispettivi controlli. I metaboliti urinari di diversi solventi ototossici e neurotossici presenti nelle miscele della verniciatura sono stati analizzati e sono stati valutati i microRNA. La prima analisi ha consentito di individuare 2 microRNA (miR-6819-5p e miR-6778-5p) che differiscono in modo statisticamente significativo fra esposti e controlli. La successiva analisi, eseguita su un campione più numeroso di lavoratori, ha permesso di identificare un sottogruppo di dodici microRNA associati significativamente ai metaboliti urinari dei VOCs presenti in maggiore concentrazione, toluene e xileni nel caso in esame. Tra i microRNA associati significativamente ai metaboliti urinari di toluene e xileni, presenti nelle vernici, alcuni, miR-589-5p, miR-941, miR-146b-3p, miR-27a-3p, sono stati precedentemen-

te individuati in studi della letteratura scientifica come microRNA disregolati in condizioni di stress ossidativo e processi infiammatori. Questa circostanza corrobora la nostra ipotesi che lo stress ossidativo giochi un ruolo essenziale nel danno uditivo indotto dall'esposizione ad agenti oto/neurotossici, quali i VOCs. L'analisi statistica multivariata, sia con tecniche di statistica classica che con tecniche di machine learning, in particolare, reti neurali disegnate ad hoc, ha mostrato una correlazione altamente significativa tra le variabili della funzionalità uditiva e i microRNA differenzialmente espressi nei lavoratori esposti rispetto ai controlli. In particolare i miR-122-5p e miR-195-5p, individuati nella letteratura scientifica come biomarcatori di patologie neurodegenerative, sono stati trovati fortemente associati ad un aumento della disfunzionalità uditiva in termini di innalzamento di soglia uditiva (Tabella 1). Sempre in Tabella 1 sono elencati i microRNA associati significativamente ad una riduzione di ampiezza delle DPOAEs.

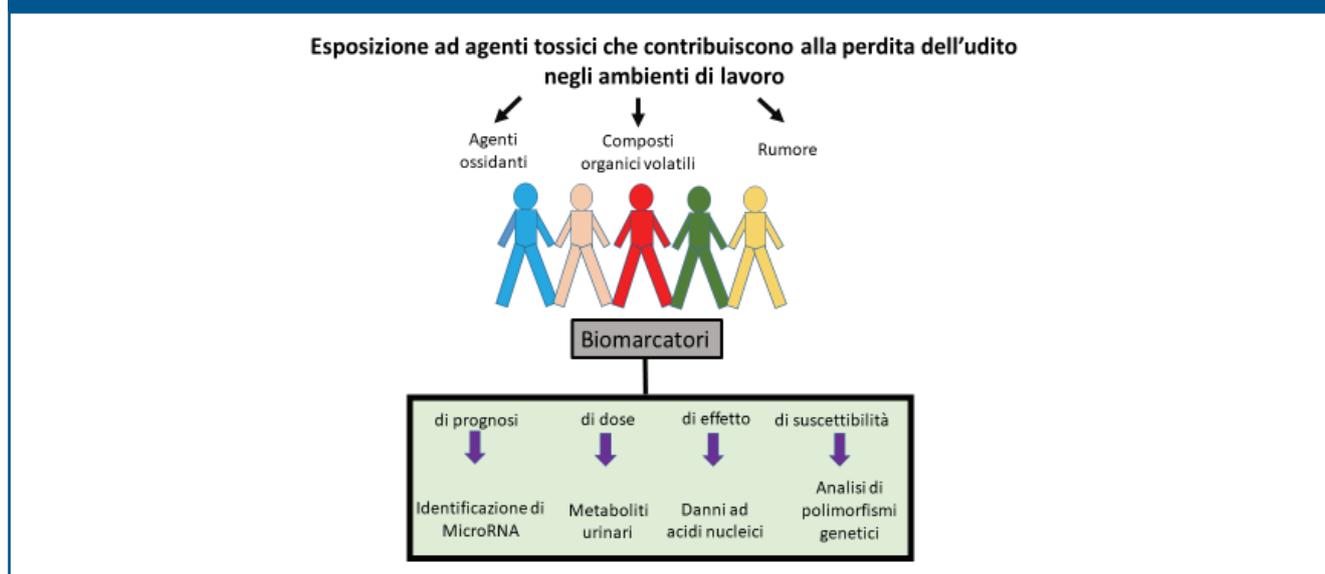
Tabella 1 Elenco di alcuni microRNA correlati a biomarcatori urinari/variabili audiologiche e relativi effetti sulla salute

microRNA	Biomarcatori urinari/variabili audiologiche	Effetti sulla salute
miR-589-5p	Acido metilippurico (metabolita dello xilene)	Stress ossidativo, processi infiammatori, cancerogenesi
miR-941		Stress ossidativo, processi infiammatori, patologie cardiache
miR-146b-3p		Stress ossidativo, processi infiammatori, patologie cerebrovascolari
miR-27a-3p		Stress ossidativo, processi infiammatori, patologie neurodegenerative
miR-122-5p	Soglia uditiva (HT)	Patologie neurodegenerative, cancerogenesi, disfunzionalità uditiva
miR-195-5p		Stress ossidativo, patologie neurodegenerative, cancerogenesi, disfunzionalità uditiva
miR-92b-5p	Emissioni otoacustiche da prodotto di distorsione (DPOAEs)	Patologie neurodegenerative, disfunzionalità uditiva
miR-497-5p		
miR-206		

Tra i biomarcatori valutati (Figura 2) sono da annoverare quelli di suscettibilità allo sviluppo del danno. Da questo punto di vista sono state eseguite le analisi dei polimorfismi genetici dei geni *human 8-Oxoguanine DNA N-Glycosylase 1* (hOGG1) e *X-Ray Repair Cross Complementing 1* (XRCC1), coinvolti nei meccanismi di riparazione del DNA. I nostri risultati dimostrano che le varianti mutanti omozigote ed eterozigote del gene hOGG1 predispongono i soggetti ad una condizione di svantaggio relativamente al rischio di danni uditivi rispetto al gene *wild type* in caso di esposizione combi-

nata a VOCs e rumore. Analogamente la variante eterozigote del gene XRCC1 rende i soggetti più vulnerabili ai danni uditivi rispetto al *wild type* e al mutante omozigote in condizioni di esposizioni multiple ad agenti neurotossici e rumore. Le varianti genetiche relative agli enzimi coinvolti nei processi del metabolismo umano sono comunque ereditabili e sono guidate dalla selezione naturale. La variabilità genetica di una qualsiasi popolazione o etnia, dovrebbe quindi essere presa in considerazione ai fini della prognosi e diagnosi di malattie.

Figura 2 Rappresentazione dell'esposizione multipla e dei biomarcatori monitorati nei lavoratori



(Inail - Dipartimento di medicina, epidemiologia, igiene del lavoro e ambientale)

CONCLUSIONI

I dati preliminari ottenuti nel biomonitoraggio dei lavoratori esposti a VOCs dimostrano che i microRNA, già ampiamente utilizzati in ambito clinico-diagnostico, sono promettenti biomarcatori di effetto epigenetico precoce nel caso di esposizione a sostanze dannose in ambito occupazionale. Le analisi di statistica multivariata hanno evidenziato delle correlazioni altamente significative tra microRNA e metaboliti urinari dei VOCs, mostrando quindi come l'esposizione a queste sostanze determini alterazioni nei profili di espressione dei microRNA. Lo studio e la caratterizzazione di geni target regolati dai microRNA e dei polimorfismi genetici degli esposti potrebbe contribuire ad aggiungere informazioni importanti sull'effetto dell'esposizione combinata a sostanze tossiche. La nostra attività di ricerca rappresenta un punto di partenza fondamentale per approfondire il ruolo dei microRNA quali biomarcatori innovativi di esposizione occupazionale

ed ambientale per la tutela della salute dei lavoratori. Infatti l'integrazione delle informazioni relative ai biomarcatori di dose e delle informazioni fornite da specifici biomarcatori epigenetici di effetto, quali i microRNA, potrebbe contribuire in maniera rilevante alla comprensione della eziologia e dei meccanismi molecolari implicati nella progressione di diverse patologie quali: malattie neurodegenerative, ipoacusia occupazionale, alcuni tipi di cancro. I pattern di espressione simili e riproducibili dei più promettenti microRNA, in caso di diverse condizioni di esposizione ambientale, alle stesse sostanze potenzialmente dannose, confermano l'affidabilità di tali biomarcatori in ambito occupazionale. Seguiranno altre campagne sperimentali con l'obiettivo di confermare la riproducibilità dei risultati ottenuti su un campione di maggiore numerosità, in modo da consentire la formulazione di strategie di intervento mirate per tutelare la salute dei soggetti coesposti a rumore e VOCs.

PER ULTERIORI INFORMAZIONI

Contatti: r.sisto@inail.it; p.capone@inail.it

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- Sisto R, Capone P, Cerini L et al. Occupational exposure to volatile organic compounds affects microRNA profiling: Towards the identification of novel biomarkers. *Toxicol. Rep.* 2020; (7): 700-710.
- Sisto R, Moleti A, Capone P. et al. MicroRNA expression is associated with auditory dysfunction in workers exposed to ototoxic solvents and noise. *Front. Public. Health. Sec. Environmental Health and Exposome.* 2022; 10:958181.
- Wilson BS, Tucci DL, Merson MH et al. Global hearing health care: new findings and perspectives. *Lancet.* 2017;390(10111):2503-2515.

PAROLE CHIAVE

MicroRNA, Rumore, Composti organici volatili, Esposizioni multiple