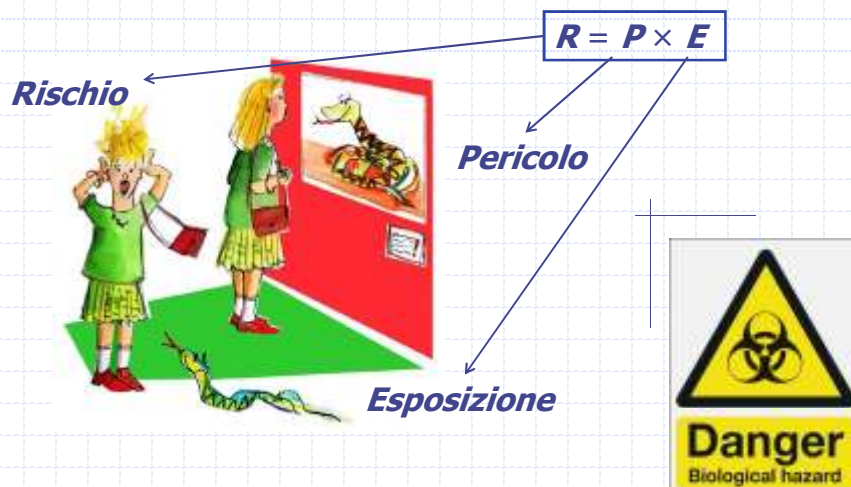


VALUTAZIONE DEI RISCHI
MUTAGENO/CANCEROGENI:
TOSSICOLOGIA GENETICA
↓
EPIDEMIOLOGIA MOLECOLARE

Igiene e Sanità Pubblica (Canale B) - Dr. Massimo Moretti

PREMESSA: RISCHIO E PERICOLO

- ◆ Nella sua definizione più semplice, il **rischio** (**R**) può essere definito come:



PREMESSA: RISCHIO E PERICOLO

PERICOLO:

- ◆ Proprietà potenziale intrinseca di un'agente (chimico, fisico o biologico), di una procedura lavorativa e/o di una attrezzature di lavoro, etc. di causare danni;

RISCHIO:

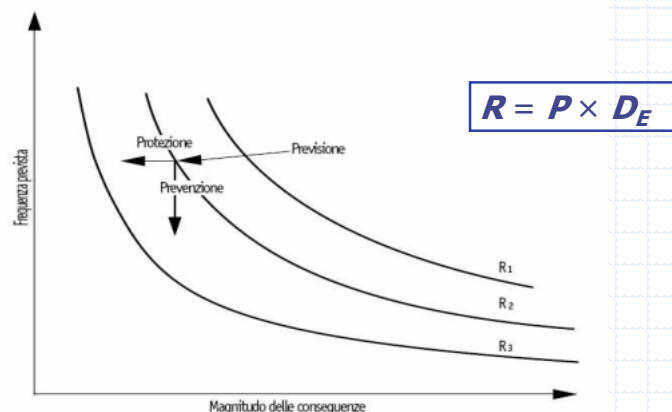
- ◆ Probabilità che da una data situazione di pericolo (in relazione alle condizioni di impiego e/o dell'entità dell'esposizione) possa manifestarsi un danno.

DANNO:

- ◆ Lesione fisica (infortunio) o alterazione negativa dello stato di salute (malattia) di un individuo, causata dal concretizzarsi di un pericolo.

PREMESSA: RISCHIO E PERICOLO

- ◆ A rigore, ci si riferisce sempre al "*rischio* di manifestazione di un determinato *danno*":



PREMESSA: RISCHIO E PERICOLO

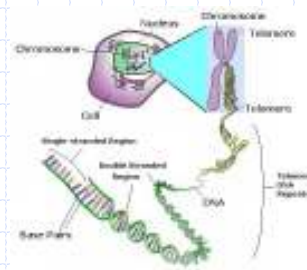
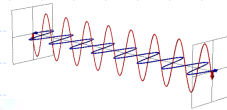
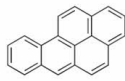
- ◆ Processo multistadi/multifattoriale della cancerogenesi:

Esposizione Fase di latenza Fase preclinica Malattia



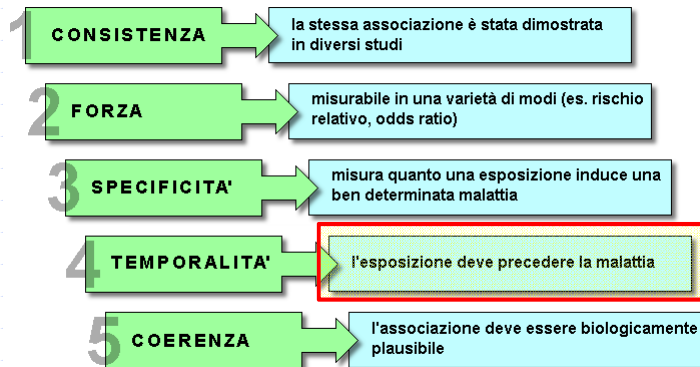
Fattori di rischio

1 n



PREMESSA: RISCHIO E PERICOLO

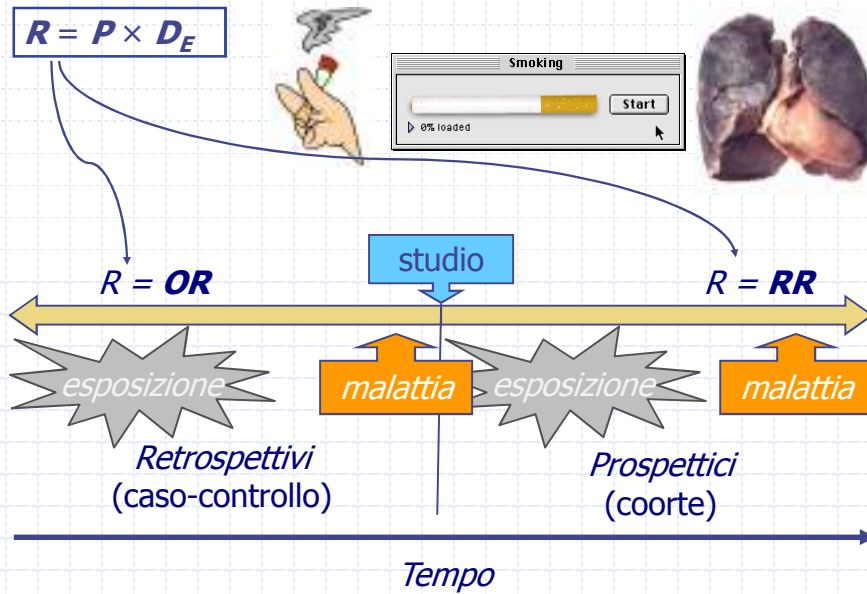
- ◆ Criteri di causalità (sintesi: Sir Austin Bradford Hill, 1965; Advisory Committee to the Surgeon General on the Health Consequences of Smoking, 1964).



www.quademodoevidenzemiologia.it

PREMESSA: RISCHIO E PERICOLO

$$R = P \times D_E$$



PREMESSA: RISCHIO E PERICOLO

◆ Nella pratica, il **rischio** è funzione di:

$$R = P \times D / k_i$$



k_i = fattore integrato di informazione, formazione, addestramento, istruzione, aggiornamento (eliminazione di comportamenti errati o inidonei), equipaggiamento, pronto intervento, etc.

PREMESSA: RISK ASSESSMENT

- ◆ È pertanto evidente come il "**rischio**" risulti un concetto **quantitativo**, essendo una grandezza **misurabile** secondo una specifica metrologia che permette di organizzare e valutare i dati in modo coerente.



PREMESSA : RISK ASSESSMENT

- ◆ Nella pratica quotidiana, la comprensione dei criteri di **valutazione del rischio** è fortemente ostacolata dall'ottica "**dialettico-quantitativa**" (dicotomica) tipicamente adottata per affrontare il problema:



Presenza



Assenza



Kg



Pesante
vs.
Leggero

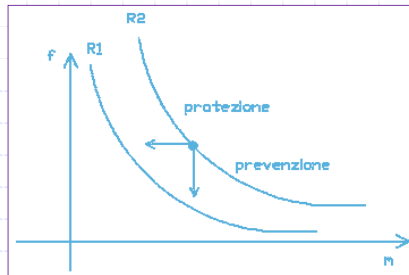
Caldo
vs.
Freddo



T°K

PREMESSA : RISK ASSESSMENT

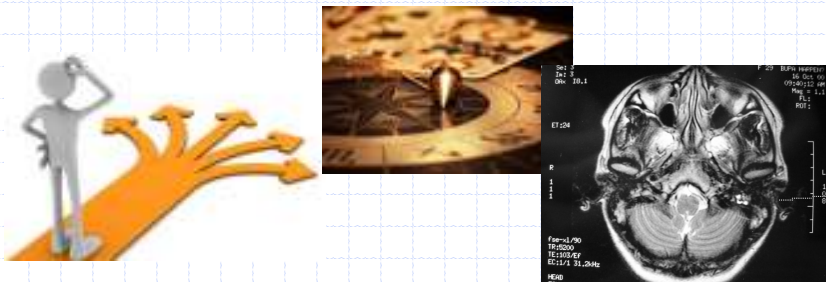
- ◆ Adottando invece l'approccio "**scientifico-quantitativo**", ne consegue che il "**rischio**", a questo punto effettivamente **misurabile**, sarà espresso in termini di "**livelli**" .. probabilistici (più o meno alti/bassi).



La **misura del rischio** è strettamente legata al concetto di **probabilità**, perché riguarda eventi futuri, che possono accadere o meno ed eventualmente manifestarsi con intensità diversa.

PREMESSA : RISK ASSESSMENT

- ◆ Nel linguaggio comune il **fattore probabilistico** complica la **percezione del rischio**, perché nella nostra realtà culturale il concetto di "probabilità" ha radici meno profonde di quello della "contrapposizione dialettica" (in una grandissima parte della popolazione l'approccio alla problematiche, anche di salute, è largamente basato su fato, fortuna, predestinazione, ...).



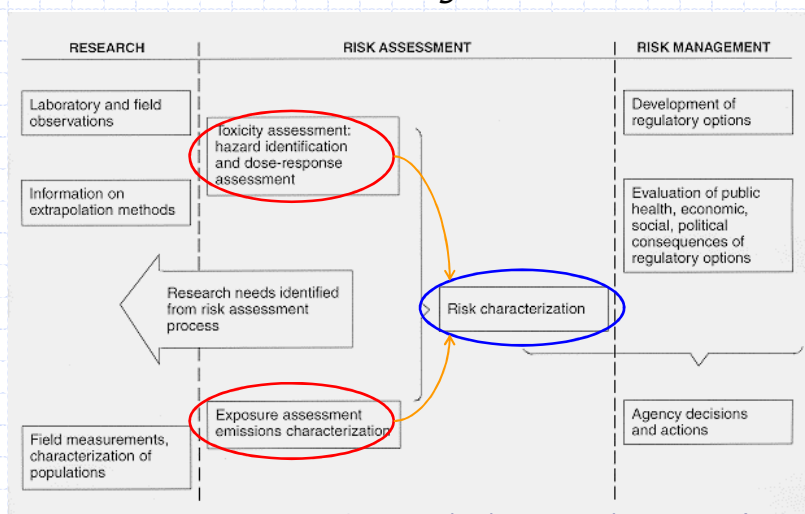
PREMESSA : RISK ASSESSMENT

Risk Assessment:

- ◆ I modelli valutativi devono prevedere:
 - identificazione dei fattori di rischio,
 - identificazione dei lavoratori esposti,
 - stima dell'entità delle esposizioni,
 - stima della gravità degli effetti che ne possono derivare,
 - stima delle probabilità che tali effetti si manifestino.

PREMESSA : RISK ASSESSMENT

Risk Assessment → Risk Management



Da: *Science and Judgment in Risk Assessment* (NRC, 1994)

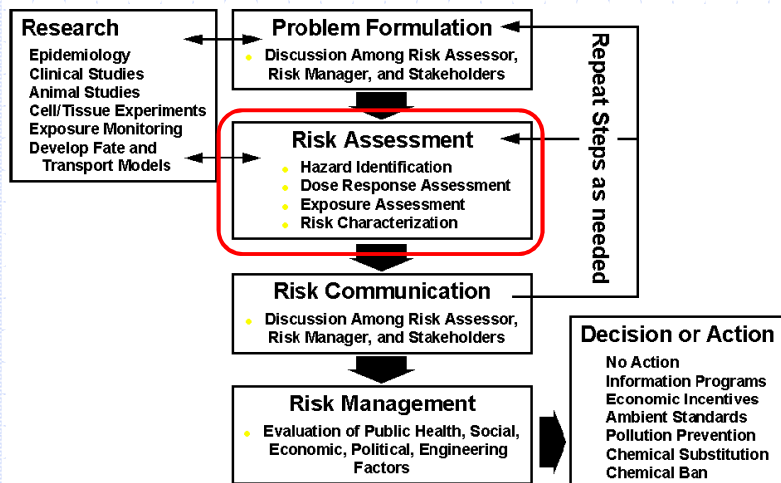
PREMESSA : RISK ASSESSMENT

Risk Assessment = Valutazione del Rischio:

- ◆ Definizione **I.S.P.E.S.L.** (Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro):
 - “insieme di tutte quelle operazioni, conoscitive ed operative, che devono essere attuate per addivenire ad una ‘stima’ del rischio di esposizione ai fattori di pericolo per la sicurezza e la salute del personale, in relazione allo svolgimento delle lavorazioni”.

PREMESSA : RISK ASSESSMENT

Risk Assessment → Risk Management

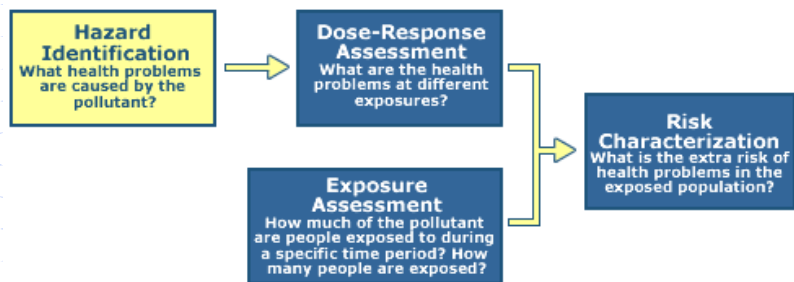


PREMESSA : RISK ASSESSMENT

US EPA: 4 Steps Risk Assessment Process:

1) Identificazione del pericolo:

The 4 Step Risk Assessment Process



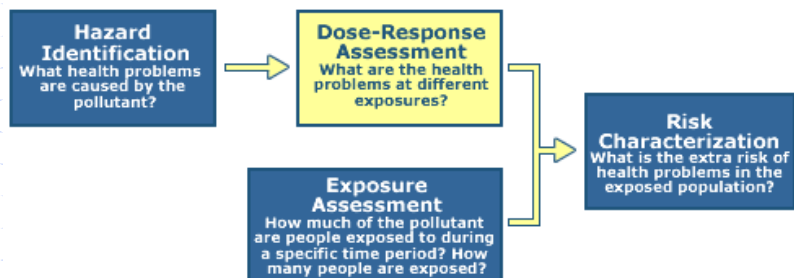
(da: US EPA: Risk Assessment Portal)

PREMESSA : RISK ASSESSMENT

US EPA: 4 Steps Risk Assessment Process:

2) Determinazione delle relazioni "dose/effetto":

The 4 Step Risk Assessment Process



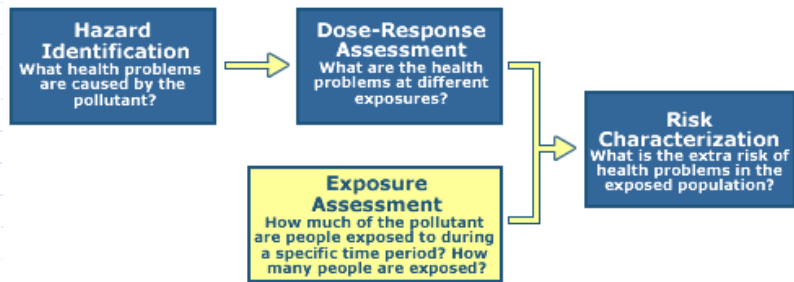
(da: US EPA: Risk Assessment Portal)

PREMESSA : RISK ASSESSMENT

US EPA: 4 Steps Risk Assessment Process:

3) Valutazione dell'esposizione:

The 4 Step Risk Assessment Process



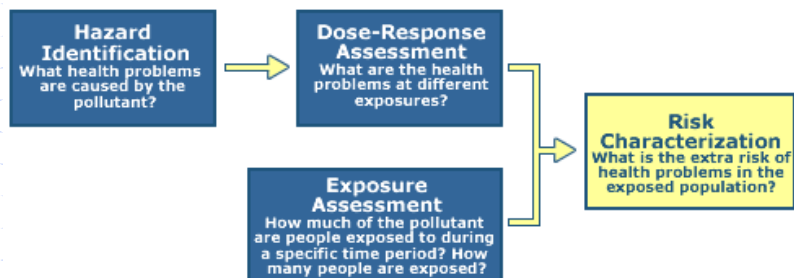
(da: US EPA: Risk Assessment Portal)

PREMESSA : RISK ASSESSMENT

US EPA: 4 Steps Risk Assessment Process:

4) Caratterizzazione del rischio:

The 4 Step Risk Assessment Process

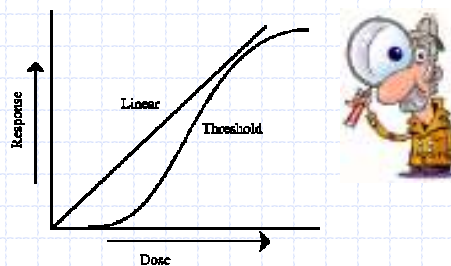


(da: US EPA: Risk Assessment Portal)

PREMESSA : RISK ASSESSMENT

Dose-Response Assessment

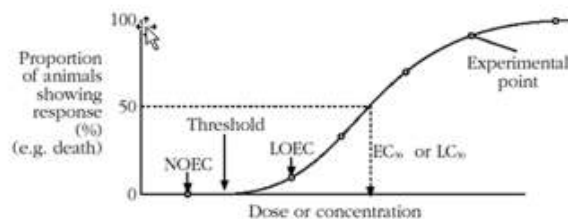
- ◆ Questa fase è finalizzata alla documentazione della relazione tra la dose ed un effetto dannoso per la salute; la forma della curva che descrive la **relazione dose-risposta** dipende principalmente dalle caratteristiche tossicologiche dell'agente in considerazione, in particolare dal meccanismo biologico (**mode of action**) alla base dell'effetto negativo:



PREMESSA : RISK ASSESSMENT

Dose-Response Assessment

- ◆ Se i dati sperimentali relativi al **mode of action** suggeriscono che la **tossicità** presenta una **soglia**, la **relazione dose-risposta** sarà **“non-lineare”**:

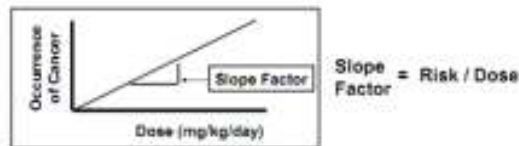


Si suppone cioè che gli effetti sanitari siano riscontrabili solo al di sopra di una certa dose e si fissa pertanto una **“concentrazione limite”** (TLV = *Threshold Limit Value*):

PREMESSA : RISK ASSESSMENT

Dose-Response Assessment

- ◆ Se invece i dati sperimentali relativi al *mode of action* suggeriscono che non è possibile definire una *soglia* per la *tossicità* (es. agenti *cancerogeni*) la *relazione dose-risposta* sarà di tipo "*lineare*".



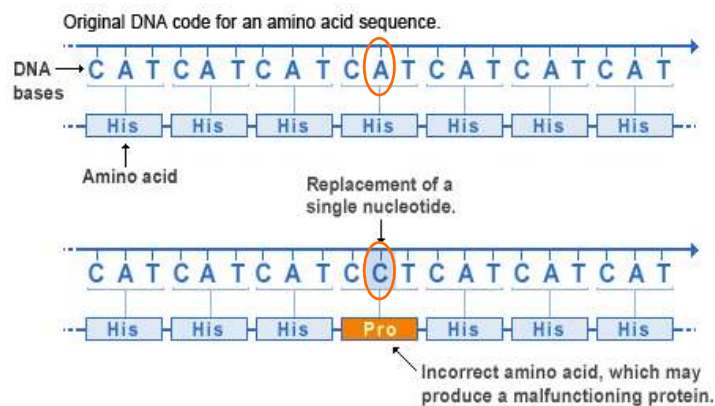
SLOPE FACTOR: Derivation is based on the assumption that every dose poses a risk; there is no safe dose.

C'è sempre un rischio finito e misurabile e si fissa pertanto una "*rischio accettabile*".

RISCHIO MUTAGENO/CANCEROGENO

Mutazioni geniche:

Missense mutation

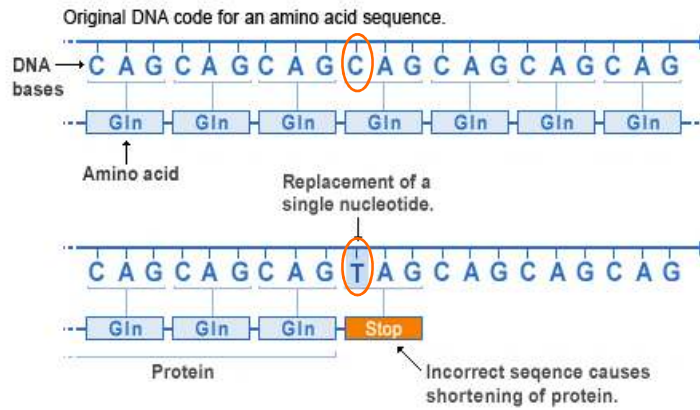


U.S. National Library of Medicine

RISCHIO MUTAGENO/CANCEROGENO

Mutazioni geniche:

Nonsense mutation

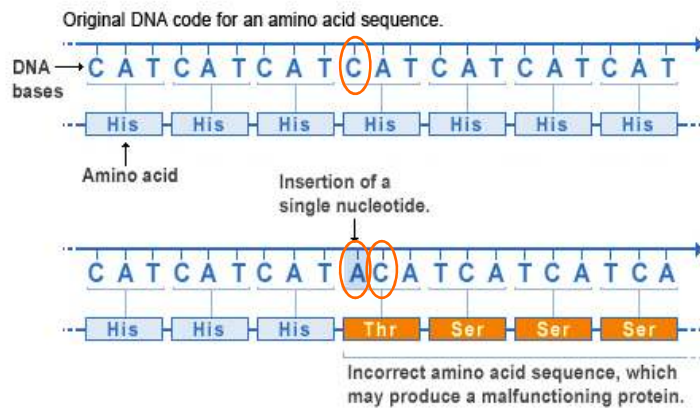


U.S. National Library of Medicine

RISCHIO MUTAGENO/CANCEROGENO

Mutazioni geniche:

Insertion mutation







U.S. National Library of Medicine

RISCHIO MUTAGENO/CANCEROGENO

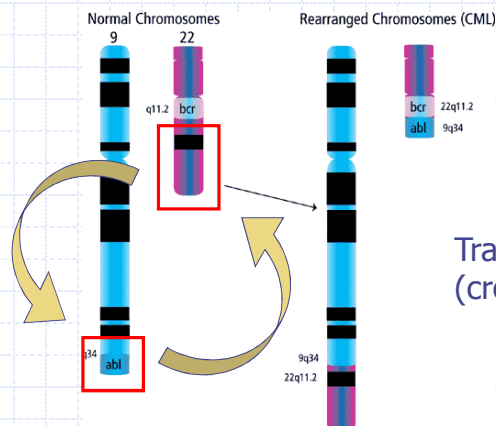
Mutazioni cromosomiche:

Examples of 2-lesion *Chromatid-type* aberrations

	INTERCHANGE	INTER-ARM INTRACHANGE		INTRA-ARM INTRACHANGE		"BREAK" DISCONTINUITY
A	 dicentric	intra-chromatid (=centric ring)	inter-chromatid (=dicentric)	intra-chromatid Interstitial deletion	inter-chromatid isochromatid deletion	
S	 reciprocal translocation	pericentric inversion	duplication/deletion	paracentric inversion	(=duplication/deletion)	 some are incomplete intra-arm intrachanges

RISCHIO MUTAGENO/CANCEROGENO

Mutazioni cromosomiche:



Traslocazione 9→22
(cromosoma "Philadelphia")

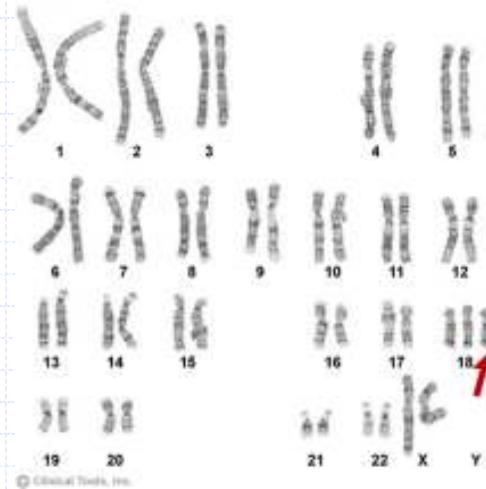
RISCHIO MUTAGENO/CANCEROGENO

Mutazioni genomiche:

- ◆ Variazioni nel numero dei cromosomi (passaggio dallo stato di **euploidia** cellulare a quello di **aneuploidia**):
 - diploidia = $n \times 2$ cromosomi;
 - aneuploidia = perdita o acquisizione di cromosomi;
 - poliploidia = $n \times m$ cromosomi ($m > 2$);
 - trisomia = acquisizione di un cromosoma in un nucleo diploide;
 - monosomia = delezione di un cromosoma.

RISCHIO MUTAGENO/CANCEROGENO

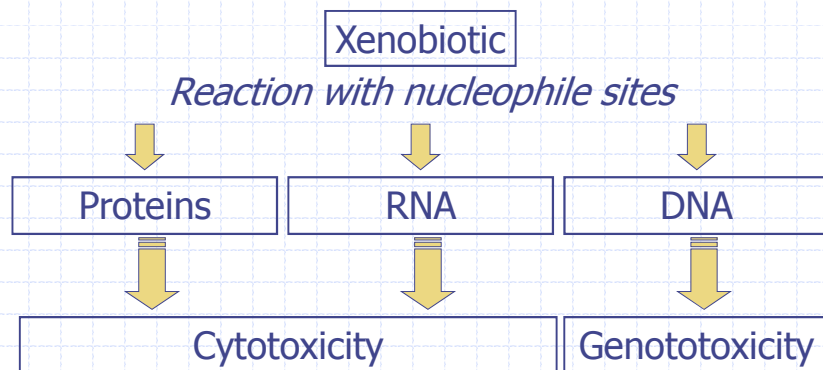
Mutazioni genomiche:



Trisomia del cromosoma 18:
Sindrome di Edwards

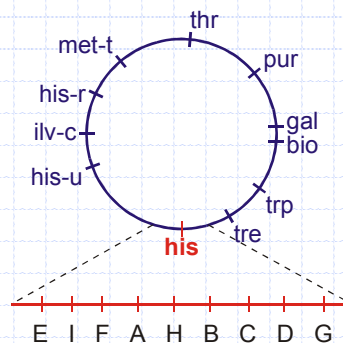
TEST DI MUTAGENESI/GENOTOSSICITÀ

- ◆ I **test di mutagenesi a breve termine** non sono in grado di rilevare effetti cancerogeni, ma sono diretti ad evidenziare **effetti biologici** strettamente correlati con quello cancerogeno, come la **mutagenicità** o, più genericamente, la **genotossicità**.



SALMONELLA/MICROSOMI TEST

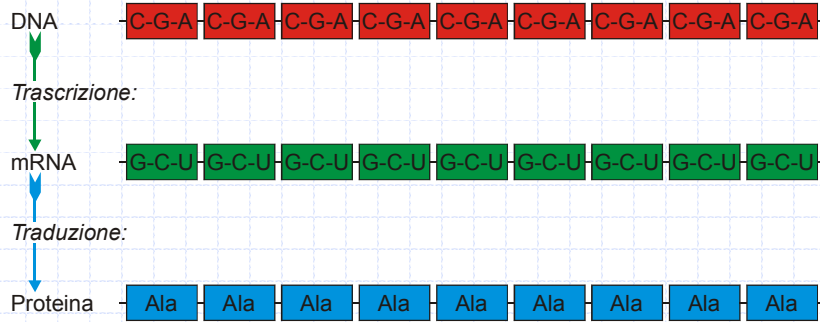
- ◆ Nel Salmonella/microsomi test vengono utilizzati ceppi di **Salmonella typhimurium** resi auxotrofi per l'istidina:



- le mutazioni indotte dalle sostanze in esame vengono evidenziate dalla loro capacità di "**retromutare**" a **prototrofi** i batteri test.

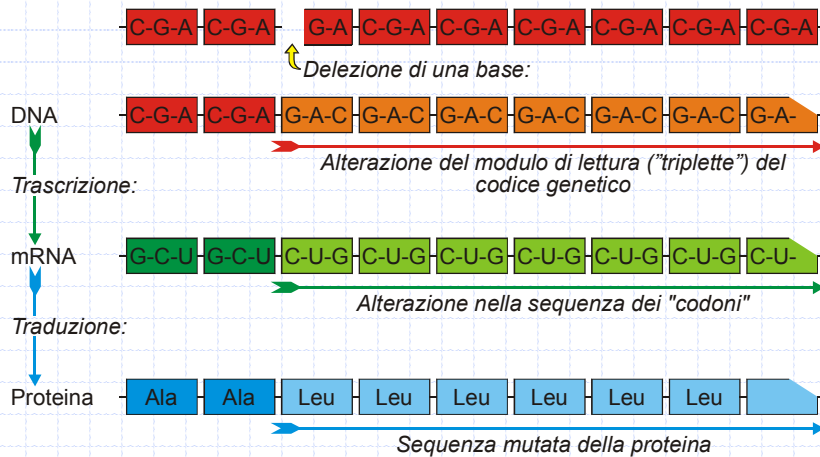
SALMONELLA/MICROSOMI TEST

◆ *S. typhimurium* genotipo "wild-type":



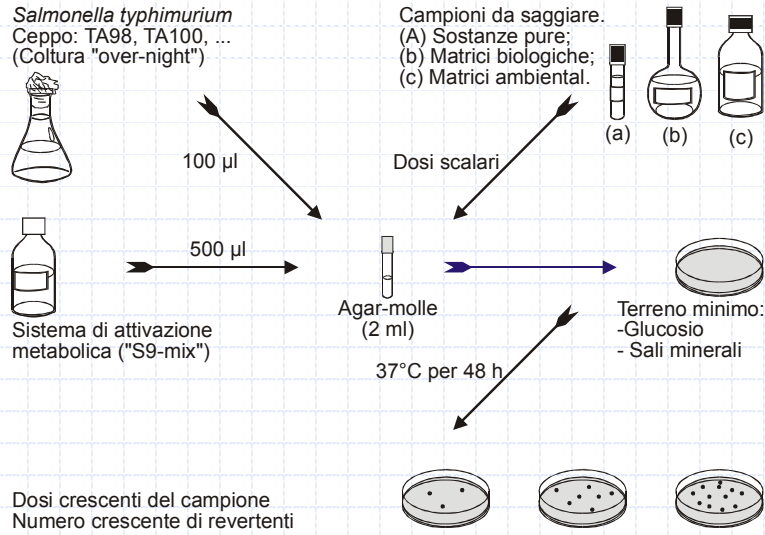
SALMONELLA/MICROSOMI TEST

◆ *S. typhimurium* genotipo "auxotrofo" (*his*-):



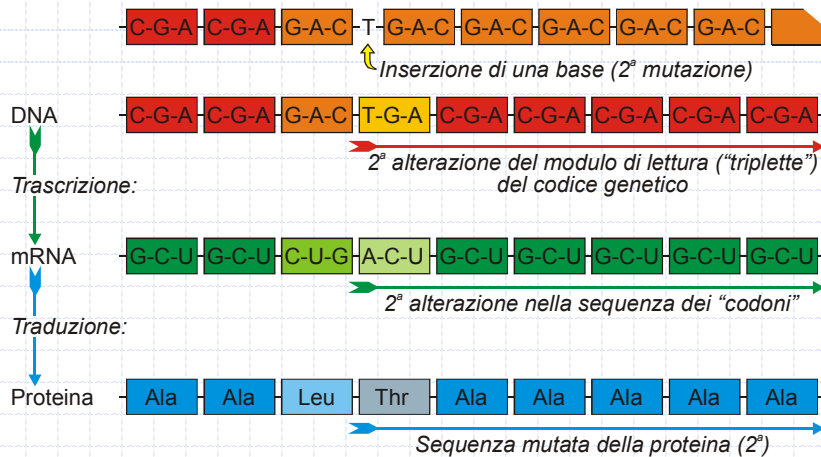
SALMONELLA/MICROSOMI TEST

Schema del test:



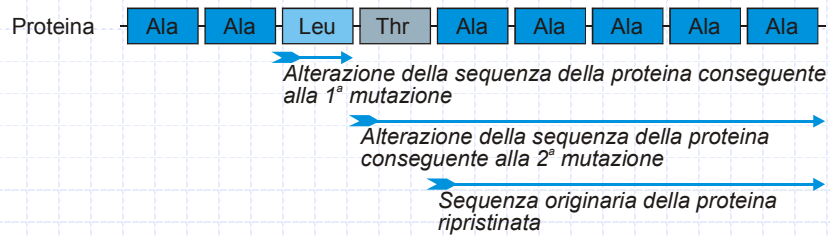
SALMONELLA/MICROSOMI TEST

S. typhimurium fenotipo "revertente-prototrofo" (*his+*):



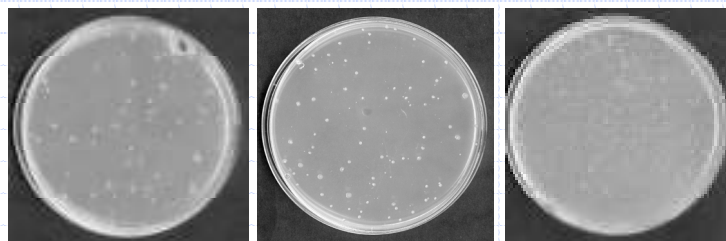
SALMONELLA/MICROSOMI TEST

◆ Principio della "reversione":



SALMONELLA/MICROSOMI TEST

◆ Risultati:

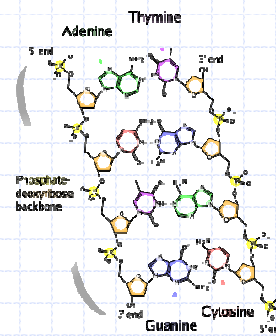


TEST DELLA COMETA

◆ Il **danno primario al DNA**, biomarcatore aspecifico ma estremamente sensibile, viene valutato utilizzando il test della cometa in condizioni alcaline (generalmente su linfociti di sangue periferico).

◆ Le principali lesioni evidenziabili con il **test della cometa** sono:

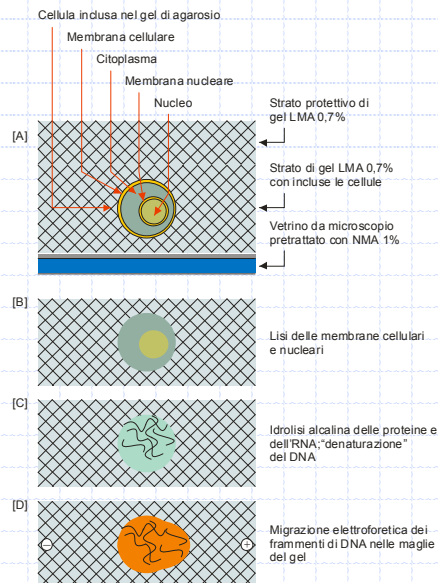
- *single-strand breaks*;
- *double-strand breaks*;
- siti alcali-labili;
- basi ossidate.



TEST DELLA COMETA

◆ Test della cometa:

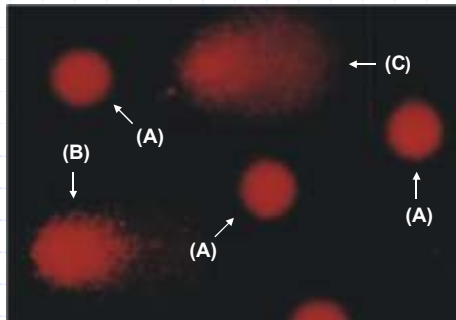
- inclusione delle cellule in microgel di agarosio;
- lisi delle membrane cellulari e nucleari;
- elettroforesi (condizioni alcaline).
- colorazione dei vetrini;
- analisi al microscopio a fluorescenza.



TEST DELLA COMETA

◆ Test della cometa:

- campo al microscopio a fluorescenza.

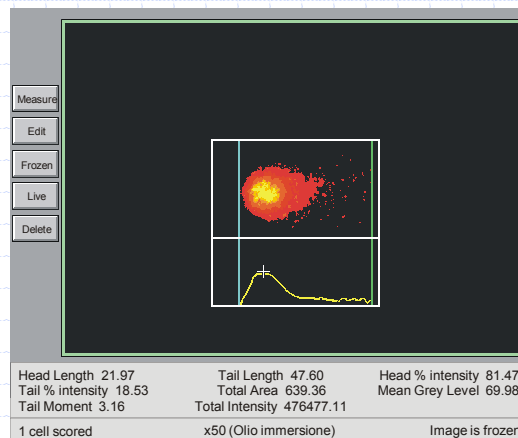


- (A) cellule con DNA non danneggiato;
- (B) cellule con DNA moderatamente danneggiato;
- (C) cellule con DNA fortemente danneggiato.

TEST DELLA COMETA

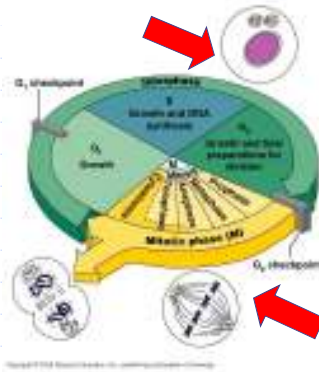
◆ Test della cometa:

- valutazione del danno al DNA in una singola cellula con sistema computerizzato di analisi di immagini:



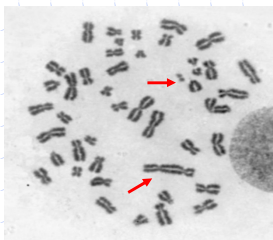
BIOMARCATORI DI EFFETTO BIOLOGICO PRECOCE

- ◆ I biomarcatori citogenetici possono essere rilevati mediante:
 - analisi in metafase (aberrazioni cromosomiche numeriche e strutturali, scambi tra cromatidi fratelli);
 - analisi in interfase (micronuclei).

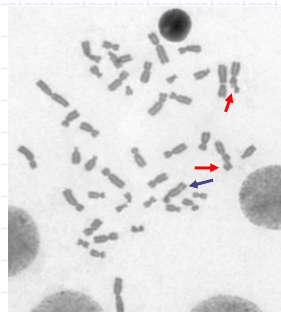


BIOMARCATORI DI EFFETTO BIOLOGICO PRECOCE

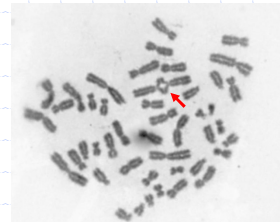
- ◆ **Aberrazioni cromosomiche** (strutturali e/o numeriche) :
 - risultano dalla rottura di interi cromosomi e dal loro successivo riarrangiamento in forme abnormi:



Dicentrico



Delezione + "Gap"

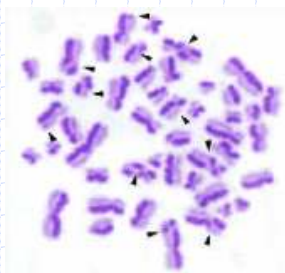


Interscambio

BIOMARCATORI DI EFFETTO BIOLOGICO PRECOCE

◆ Scambi tra cromatidi fratelli:

- si formano tipicamente in caso i danni al DNA si manifestino durante la metafase, in questo caso la cellula mette in atto dei meccanismi di riparazione durante i quali porzioni uguali dei due cromatidi opposti del cromosoma possono scambiare la loro posizione (scambi simmetrici):

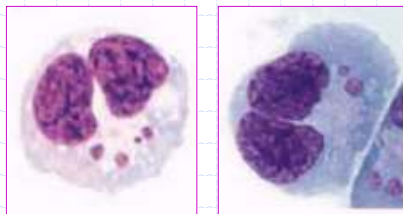


Scambi tra cromatidi fratelli (SCE)

BIOMARCATORI DI EFFETTO BIOLOGICO PRECOCE

◆ Micronuclei:

- corpuscoli di forma rotondeggiante, di dimensioni che possono variare da 1/16 a 1/3 del nucleo principale, contenenti materiale genetico e che possono trovarsi nel citosol al termine del ciclo cellulare.



Micronuclei

BIOMARCATORI DI EFFETTO BIOLOGICO PRECOCE

◆ **Micronuclei:**

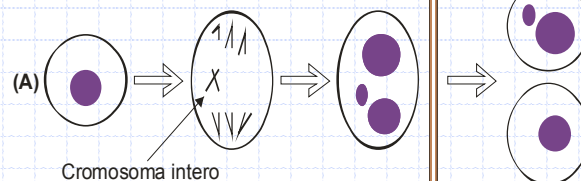
- si formano, durante l'anafase della mitosi, dalla condensazione di frammenti di cromosomi acentrici o da cromosomi interi che non vengono incorporati nei nuclei principali delle cellule figlie;
- i micronuclei possono generarsi attraverso vari meccanismi, riconducibili essenzialmente:
 - ◆ all'azione di agenti clastogeni, che causano rotture cromosomiche dirette;
 - ◆ a disfunzioni del fuso mitotico, che possono essere generate da agenti aneuploidizzanti;
 - ◆ alla combinazione di entrambi i meccanismi.

BIOMARCATORI DI EFFETTO BIOLOGICO PRECOCE

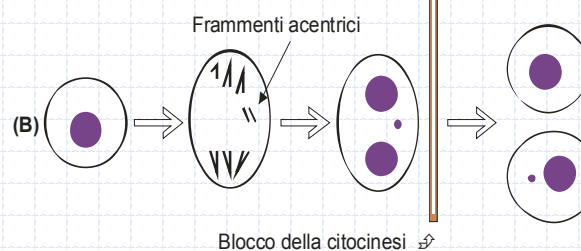
◆ **Micronuclei:**

- meccanismi di formazione.

Effetto aneuploidizzante



Effetto clastogeno



BIOMARCATORI DI EFFETTO BIOLOGICO PRECOCE

◆ Bonassi S. *et al.* (2000) Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently from exposure to carcinogens. *Cancer Research*, 60(6):1619–1625.

- Logistic regression models indicated a statistically significant increase in risk for subjects with a high level of chromosomal aberrations compared to those with a low level in the Nordic cohort (odds ratio, 2.35; 95% confidence interval, 1.31-4.23) and in the Italian cohort (odds ratio, 2.66; 95% confidence interval, 1.26-5.62). ...

... ..

BIOMARCATORI DI EFFETTO BIOLOGICO PRECOCE

◆ Bonassi S. *et al.* (2006) An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, 28(3):625–631.

- A significant increase of all cancers incidence was found for subjects in the groups with medium (RR=1.84; 95% CI: 1.28-2.66) and high micronuclei frequency (RR=1.53; 1.04-2.25).

Carcinogenesis vol.28 no.3 pp.625-631, 2007
doi:10.1093/carcin/bgl1177
Advance Access publication September 14, 2006

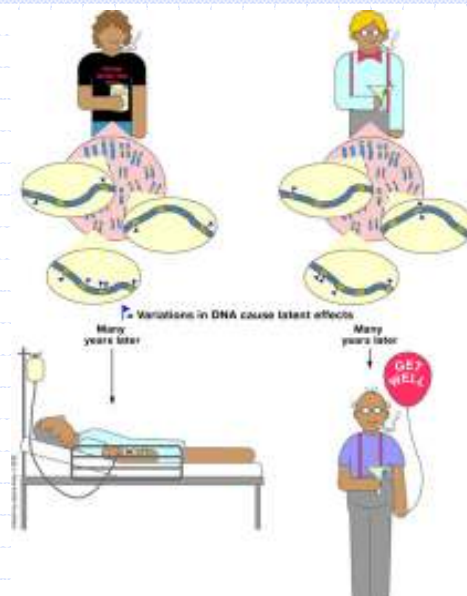
An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans

BIOMARCATORI DI EFFETTO BIOLOGICO PRECOCE

◆ "Reporter genes":

- geni che non svolgono un ruolo diretto nel processo della cancerogenesi, ma che se mutati danno origine a fenotipi facili da individuare (bioindicatori della frequenza di mutazioni somatiche);
- i geni reporter di più ampio impiego in epidemiologia molecolare sono:
 - ◆ gene codificante per la ipoxantina-guanina fosforibosil-transferasi (HPRT);
 - ◆ gene codificante per la glicoforina-A (GPA).

BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITÀ INDIVIDUALE



BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITÀ INDIVIDUALE

◆ Mutazioni:

- interessano geni correlati all'insorgenza di tumori (es. geni deputati al controllo del differenziamento e del ciclo cellulare), risultano poco diffuse nella popolazione (frequenza <1%), ma sono altamente correlate all'evento clinico (penetranza elevata).

◆ Polimorfismi:

- sono rappresentati da mutazioni molto diffuse nella popolazione (frequenza 1-50%), ma scarsamente correlate all'evento clinico (penetranza bassa).

BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITÀ INDIVIDUALE

◆ Tra i geni tumore-correlati i **proto-oncogeni** codificano per proteine coinvolte nella regolazione e nell'induzione del ciclo cellulare:

- fattori di crescita (*FGF3, FGF4*);
- fattori di trascrizione (*JUN, FOS, MYC*);
- proteine chinasi (*ABL-1, FES, RET*);
- recettori di membrana per fattori di crescita (*ERBB2, CSF1R*);
- proteine deputate alla trasduzione del segnale (*BRAF*);

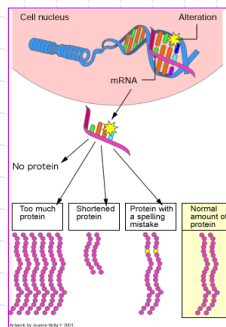
◆ I proto-oncogeni possono essere attivati ad oncogeni in seguito a mutazioni puntiformi, riarrangiamenti cromosomici ed inserzione virale.

BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITÀ INDIVIDUALE

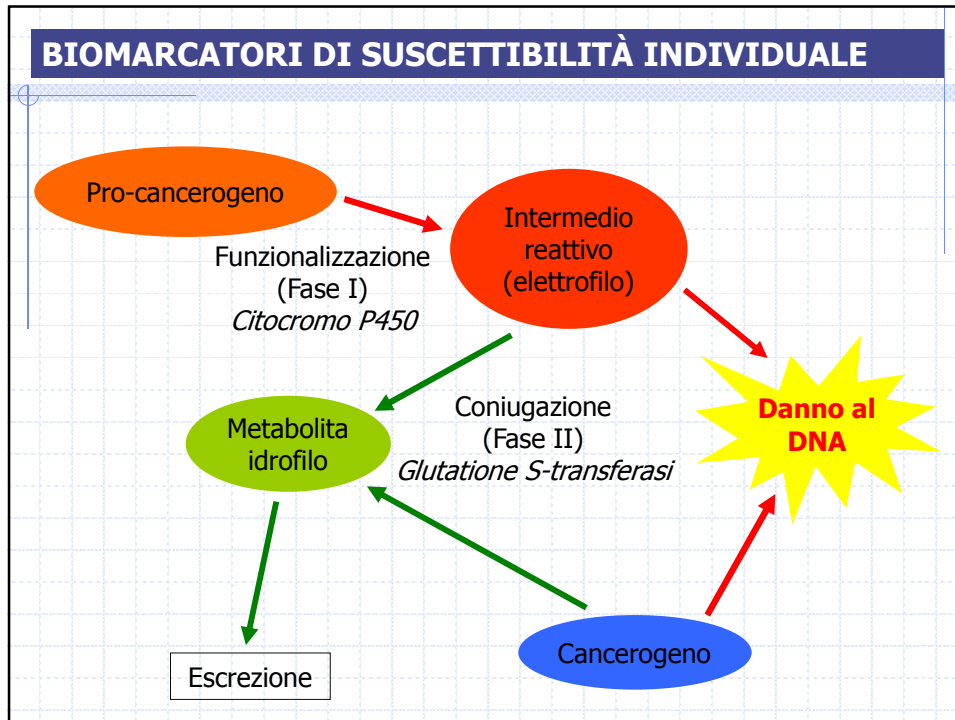
- ◆ Gli **oncosoppressori**, invece, sono geni altamente conservati (*APC*, *BRCA1*, *BRCA2*, *MEN1*, *NF1*, *RB1*, *TP53*) che codificano per proteine di membrana, citoplasmatiche, nucleari che inibiscono la crescita e la divisione cellulare:
 - ad esempio, il gene *TP53* codifica per la proteina p53 che svolge un ruolo centrale nella inibizione della crescita di cellule con danni al DNA, per cui la perdita di tale attività a seguito di mutazioni nel gene *TP53* causa la promozione della proliferazione di cellule con genoma alterato.

BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITÀ INDIVIDUALE

- ◆ Molti geni che codificano per gli enzimi coinvolti nel **metabolismo degli xenobiotici** o per gli enzimi deputati alla **riparazione del DNA** sono polimorfici, ovvero esistono nella popolazione in diverse forme alleliche dello stesso gene.
- ◆ A varianti alleliche corrispondono attività enzimatiche diverse.

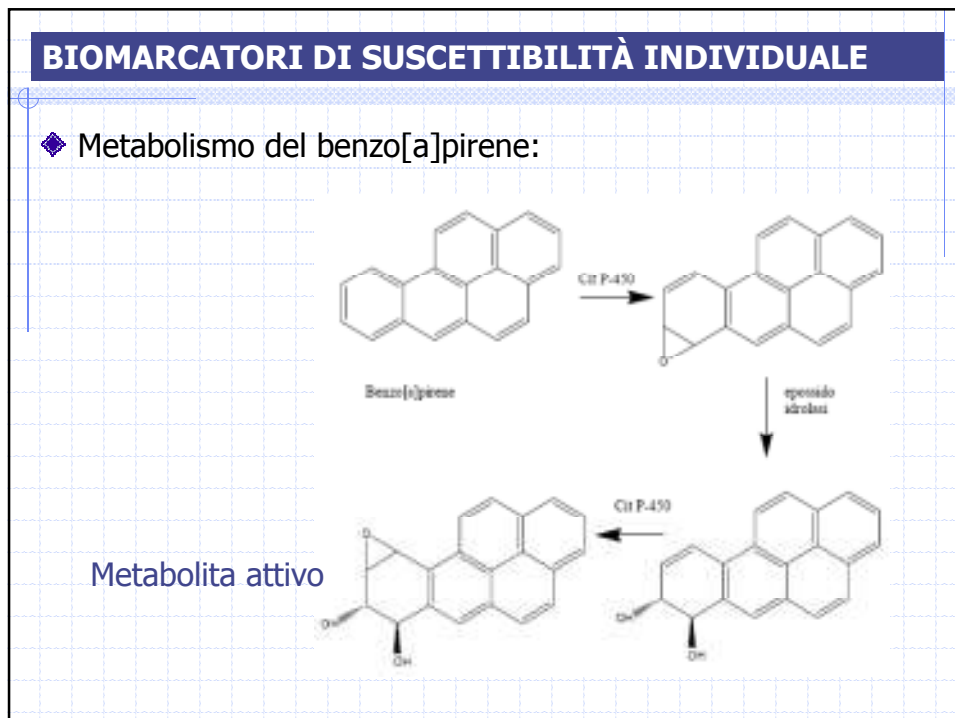


BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITÀ INDIVIDUALE



BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITÀ INDIVIDUALE

◆ Metabolismo del benzo[a]pirene:



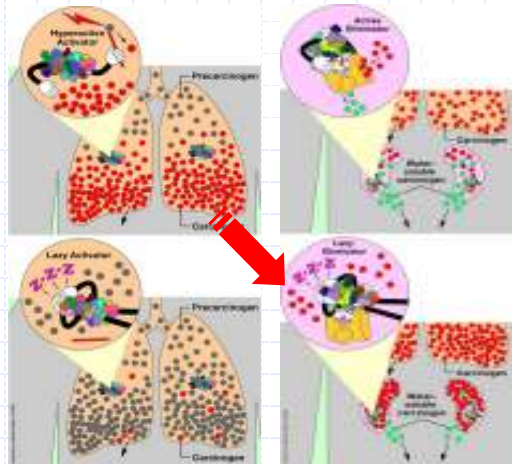
BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITÀ INDIVIDUALE

◆ Polimorfismi metabolici:

- combinazioni favorevoli / sfavorevoli:

Esempio:

- Iperattivatore
- Lento eliminatore



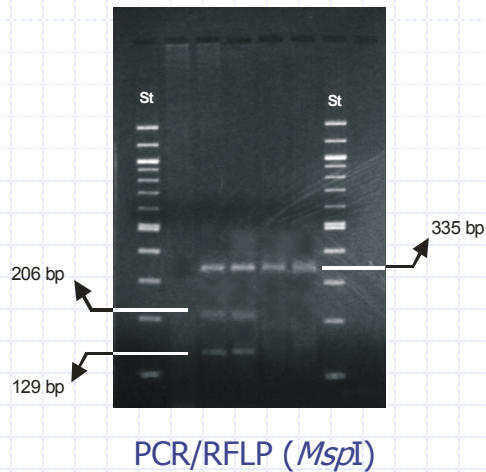
BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITÀ INDIVIDUALE

◆ Polimorfismi metabolici - "CYP1A1":

- al momento sono noti 4 principali polimorfismi nel gene *CYP1A1*, ai quali è stato assegnato un numero che si riferisce, cronologicamente, all'ordine di pubblicazione, preceduto dal simbolo "*" (*CYP1A1**1 definisce, quindi, il tipo selvatico);
- una mutazione dell'esone 7, la transizione A4889G, conferisce un aumento di almeno 3 volte dell'attività catalitica (polimorfismo *CYP1A1**3 o Ile→Val).

BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITÀ INDIVIDUALE

◆ Polimorfismi metabolici - "CYP1A1":



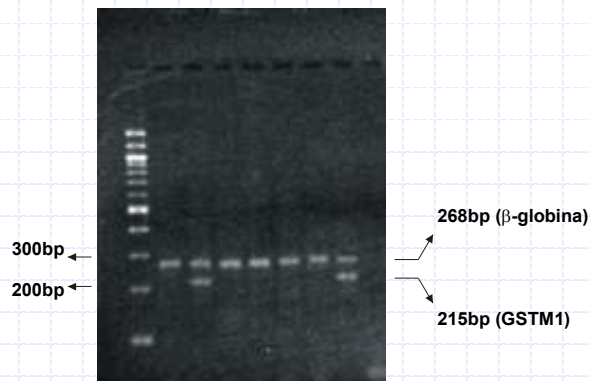
BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITÀ INDIVIDUALE

◆ Polimorfismi metabolici - "GSTM1":

- i primi polimorfismi delle GST ad essere determinati sono quelli di classe μ e sono stati caratterizzati sia misurando l'attività enzimatica in relazione ad un dato substrato (*trans*-stilbene ossido), sia isolando ed identificando gli isoenzimi;
- il gene (*GSTM1*) che codifica per l'isoforma GSTM1 è polimorfico e presenta 4 varianti alleliche, tra queste la variante *GSTM1*0* (allele nullo) determina nella forma omozigote la mancanza dell'attività enzimatica: circa il 50% della popolazione caucasica manca dell'attività della GSTM1.

BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITÀ INDIVIDUALE

◆ Polimorfismi metabolici - "GSTM1":



RISCHIO GENOTOSSICO E POLIMORFISMI GENETICI

Esposizione ambientale	Polimorfismo	Effetto
Ammine aromatiche del fumo di sigaretta	Lenti acetilatori (NAT2)	Aumento di rischio per cancro alla vescica
Arilammine eterocicliche da pirolisi di carni cotte	Veloci acetilatori (NAT2)	Aumento di rischio per cancro colonrettale
Idrocarburi policiclici aromatici da fumo di sigaretta	Deficienza di GST (GSTM1*0)	Aumento di rischio per cancro al polmone
Esposizione a ossido di etilene, butadiene, stirene	Deficienza di GST (GSTT1*0)	Aumento dei livelli di danno cromosomico

SUSCETTIBILITA' GENETICA INDIVIDUALE

◆ La suscettibilità genetica all'azione dei cancerogeni si esprime soprattutto ai bassi livelli; da questo discendono almeno due conseguenze rilevanti da considerare nelle scelte di politica ambientale:

- 1) le "soglie accettabili" di esposizione, comunque definite, dovrebbero tener conto dell'esistenza nella popolazione di sottogruppi a più alto rischio di malattia e, di conseguenza, essere adeguatamente abbassate;
- 2) nelle indagini epidemiologiche la suscettibilità genetica dovrebbe essere tenuta nella giusta considerazione, in modo da aumentare la probabilità di evidenziare relazioni causali con agenti ambientali.

SUSCETTIBILITA' GENETICA INDIVIDUALE

◆ Del tutto privo di fondamenti è invece un uso delle conoscenze sulla suscettibilità genetica per selezionare i lavoratori meno suscettibili all'azione dei cancerogeni:

- 1) un principio senza il quale tutta l'etica medica perderebbe di significato è che "non fare del male" viene prima di "fare del bene", in altre parole evitare l'esposizione a sostanze tossiche è un obbligo morale di ordine superiore rispetto a prevenire i danni attraverso altri strumenti come lo screening genetico;
- 2) la selezione genetica avrebbe una ricaduta inaccettabile, ovvero la discriminazione razziale, infatti i polimorfismi metabolici mostrano diversa distribuzione nei diversi gruppi etnici.

NUOVI BIOMARCATORI

- ◆ Nuove tecniche di biologia molecolare, nel campo sia della genomica che della proteomica, offrono la possibilità di sviluppare una nuova serie di biomarcatori per valutare il rischio genotossico.
- ◆ Particolarmente attraenti sono tecniche come il cDNA-*microarray* (insieme di sequenze di DNA a elica singola immobilizzate su una superficie solida) per lo studio dei profili di **espressione genica**:



NUOVI BIOMARCATORI

