

# GLI SVILUPPI DELLA SCIENZA BASATA SULL'EVIDENZA

L'INTEGRAZIONE FRA EPIDEMIOLOGIA E TOSSICOLOGIA STA SEMPRE PIÙ CRESCENDO E SI FA STRADA UNA STRATEGIA VOLTA A UNA MIGLIORE IDENTIFICAZIONE DEI RISCHI PER LA SALUTE. GLI APPROCCI MULTIDISCIPLINARI RIESCONO A INTEGRARE MOLTEPLICI COMPETENZE E CONOSCENZE, GRAZIE ANCHE A STRUMENTI INFORMATICI INNOVATIVI.

**E**pidemiologia e tossicologia sono due discipline volte alla identificazione dei fattori correlati con le patologie. Entrambe concorrono alla valutazione dei rischi da esposizione e alla classificazione dei composti chimici. Storicamente, tuttavia, la tossicologia si è evoluta come una scienza a supporto delle evidenze epidemiologiche, soprattutto di patologie complesse. Ne troviamo un esempio illuminante nella storia dello studio della cancerogenesi chimica, che, oggi, più modernamente definiremmo cancerogenesi ambientale. La relazione causale fra esposizione e tumore fu descritta per la prima volta nel 1775 da Sir Percivall Pott, che identificò l'esposizione alla fuliggine quale causa del tumore dello scroto degli spazzacamini, poi classificato come un carcinoma delle cellule squamose.

Molto più tardi, nel 1918, Yamagiwa e Ichikawa eseguirono il primo studio di tossicologia nell'animale per confermare le osservazioni di Pott, ma solo nel 1933 si riuscì a comprendere che l'agente cancerogeno era rappresentato dagli idrocarburi policiclici aromatici.

Nello stesso anno Theodor Boveri pubblicava il primo lavoro sulle aberrazioni cromosomiche. Nasceva così un assioma che è restato inalterato per quasi settanta anni: l'esposizione ambientale determina mutazioni indotte da inquinanti genotossici e questa interazione è la causa di patologie complesse.

Su queste basi culturali, la tossicologia ha iniziato a concentrarsi su test *in vitro* e *in vivo* che dimostrassero le capacità mutagene delle sostanze e l'epidemiologia ha continuato a investigare le relazioni causa-effetto nelle popolazioni esposte. Per alcune classi di composti, quali i mutageni, i cancerogeni e i tossici per il sistema e la funzione riproduttiva, i risultati originati dalle due discipline sono stati utilizzati contemporaneamente per classificare tali composti in base alla loro pericolosità (certa, nel caso



FOTO: ARCH. ARPAE EMILIA-ROMAGNA

si disponesse di dati epidemiologici, probabile sulla base dei soli dati *in vivo*, possibile su dati tossicologici evidenti, ma non sufficienti), ma senza mai cercare una lettura integrata delle informazioni che le due discipline fornivano.

Il divario tra epidemiologia e tossicologia ha iniziato a farsi più evidente, man mano che le conoscenze in campo genetico e molecolare avanzavano. Mentre la tossicologia iniziava a riscrivere la storia naturale della patologia in tappe contrassegnate da eventi molecolari e la medicina si avvantaggiava di tali risultati, integrando nei percorsi diagnostici, prognostici e terapeutici i biomarcatori di rischio e di effetto, la nascente epidemiologia molecolare faceva non poca fatica a identificare marcatori di esposizione che fossero sufficientemente specifici per essere integrati nella descrizione della causalità degli effetti. La seconda metà degli anni 90 è segnata da una intensa ricerca dei marcatori di suscettibilità, spesso legati a polimorfismi di popolazione, leggere

varianti dell'assetto di alcuni geni che sono in grado di conferire una maggiore o minore suscettibilità alle esposizioni. L'identificazione di questi polimorfismi permise di comprendere meglio alcuni risultati di studi epidemiologici, altrimenti difficili da interpretare.

È solo all'alba del terzo millennio, tuttavia, che si creano i presupposti per un'effettiva integrazione delle due discipline, quando le nuove tecnologie omiche vengono amalgamate nella nascente disciplina della tossicogenomica, che coniuga la tossicologia con la genomica. In pochi anni, la tossicologia si evolve nella tossicologia predittiva, un approccio basato su una valutazione meccanicistica degli eventi che determinano l'effetto finale. Non è, quindi, sufficiente stabilire il nesso causale fra esposizione ed effetto, ma è necessario spiegare il modo e il meccanismo con cui dall'esposizione si giunge all'effetto. L'era della tossicogenomica, e in

particolare della trascrittomiche, ha aperto una finestra su percorsi inesplorati di conoscenza e ha gettato le basi perché la tossicologia e l'epidemiologia potessero trovare non un punto di incontro, semplicemente armonizzando i propri modelli predittivi, ma un ruolo specifico in una strategia integrata volta all'identificazione dei rischi per la salute basati sull'evidenza fenotipica e la plausibilità biologica.

La tecnologia *microarray*, che resta ancora oggi l'applicazione della tossicogenomica più utilizzata, consente di monitorare l'espressione di decine di migliaia di geni modulati nello stesso momento e di identificare profili di espressione genica indotti da differenti composti o associati a particolari condizioni fisiologiche o patologiche. Per ogni condizione è, quindi, possibile ottenere un profilo di geni modulati che costituiscono l'impronta specifica di una determinata esposizione o condizione fisiopatologica. Più di un decennio di studi di tossicogenomica hanno alimentato ampi database che supportano i cosiddetti studi *"in-silico"*, studi che utilizzano dati preesistenti per creare nuove correlazioni tra esposizioni ed effetti, con l'ausilio dei potenti strumenti di calcolo offerti dalla bioinformatica. Alcuni database si riferiscono a specifici utilizzi, come quelli relativi ai farmaci, quali il *Japanese Toxicogenomics Project* (Tgp o TG-GATEs) o DrugMatrix, entrambi pubblici e gratuiti.

Noi stessi abbiamo utilizzato Tgp, che si basa su 20.000 dati di *microarray* relativi a 170 composti, per sviluppare un innovativo metodo, recentemente pubblicato, per il calcolo di una dose soglia al di sotto della quale non c'è modulazione genica (Notel), un approccio che sarebbe stato impossibile basandosi esclusivamente sui dati sperimentali generati nei nostri laboratori su qualche decina di composti.

Altri database, quali il *Comparative Toxicogenomics Database* (Ctd) sono ancora più adatti per analizzare gli effetti delle esposizioni ambientali. Ctd include più di 200.000 correlazioni tra modulazioni geniche ed esposizioni ambientali, alimentate da oltre 26.000 pubblicazioni scientifiche e derivate dall'incrocio di circa 6.000 fattori ambientali e più di 20.000 geni in 336 organismi viventi, uomo incluso.

L'epidemiologia molecolare ha tratto nuova linfa dall'applicazione della tossicogenomica, soprattutto nel campo delle patologie complesse di origine ambientale, i tumori, il diabete,

la patologia cardiovascolare. I grandi traguardi sono stati raggiunti con un approccio multidisciplinare, portato avanti da gruppi di ricerca che hanno saputo integrare e amalgamare le diverse competenze al loro interno, quelle proprie dell'epidemiologia, della biologia molecolare, della tossicologia, della biostatistica e, ultima, ma non ultima, la bioinformatica.

Ne è un esempio eclatante il *Molecular Epidemiology Working Group* dell'*American Association for Cancer Research*, negli Stati Uniti, che ha traghettato la ricerca sulle cause di tumore dall'identificazione del nesso causale con i cancerogeni chimici e dalla identificazione della popolazione a rischio, all'individuazione dei geni candidati e alla delucidazione dei *pathway* metabolici dei tumori ormono-dipendenti, mammella, prostata ed endometrio, la cui storia naturale coinvolge enzimi che possono essere considerati marcatori di esposizione a distruttori endocrini presenti nell'ambiente.

Lo studio dell'interazione tra gene e ambiente, declinata non solo in chiave tossicologica, ma anche in chiave epidemiologica, è reso possibile non solo dalla disponibilità delle banche dati di tossicogenomica, ma anche dagli studi che già coniugano dati ambientali con dati di patologie e di varianti geniche, quali il *genome-wide association study* (Gwas), l'*environment-wide association study* (Ewas), o il database *Variants Informing Medicine* (Varimed). La letteratura scientifica si arricchisce ogni giorno di studi *data-driven*, che utilizzano la mole di informazioni già prodotte per le verifiche *in-silico* delle correlazioni fra esposizioni ambientali ed effetto e ne descrivono meccanismo e modo d'azione.

Negli ultimi anni è stato proposto uno schema concettuale che raccoglie l'esigenza di integrazione dei dati ottenuti a livello molecolare e cellulare, propri della tossicologia predittiva, con gli effetti ottenuti nei cosiddetti *end-point* apicali, organi e organismi, studiati dalla tossicologia classica, fino ad arrivare a definire gli effetti sulla popolazione, campo di eccellenza dell'epidemiologia. A questo schema è stato dato il nome di *adverse outcome pathway* (Aop), un nome che definisce esattamente il procedere dell'effetto avverso, ossia della patologia originata dall'esposizione, attraverso tappe discrete che vanno dagli effetti precoci a livello molecolare e cellulare fino all'effetto sulla popolazione. Gli Aop si prestano a essere popolati con i dati pre-esistenti e a mettere in luce lacune conoscitive che possono essere colmate da nuovi studi.



FOTO: ARPAE EMILIA-ROMAGNA

Uno dei primi esempi di uno studio che ben si adatta al paradigma Aop è rappresentato da Monitor, lo studio coordinato da Arpae per il monitoraggio del possibile impatto degli inceneritori presenti in Emilia-Romagna sulla salute della popolazione residente. I dati ottenuti dagli studi di tossicologia predittiva integrati con gli studi epidemiologici disegnano un Aop per gli esiti riproduttivi, rappresentati dai parti pre-termine, dove l'effetto nella popolazione, corroborato dall'evidenza epidemiologica, trova riscontro nella delucidazione dell'interazione gene-ambiente e nell'identificazione dei geni responsabili, e dove lo studio tossicologico dà riscontro della causa, non ascrivibile a una singola sorgente di emissione, ma più generalmente all'inquinamento dell'aria. Il progresso tecnologico non potrà altro che favorire una sempre maggiore integrazione fra le due discipline, un'integrazione che dovrà essere supportata, qui in Italia, al pari di quanto già altri paesi europei ed extraeuropei hanno realizzato, da solidi percorsi formativi, universitari e, in particolare, post-universitari, che favoriscano prima di tutto l'integrazione dei linguaggi, delle conoscenze e delle competenze.

**Annamaria Colacci**

Arpae Emilia-Romagna