

MAURIZIO PROIETTI

INQUINAMENTO E MALATTIE

Autismo, permeabilità intestinale, celiachia, sensibilità chimica multipla



EDIZIONI MINERVA MEDICA

ISBN: 978-88-7711-925-4

©2018 – EDIZIONI MINERVA MEDICA S.p.A. – Corso Bramante 83/85 – 10126 Torino
Sito Internet: www.minervamedica.it / *e-mail:* minervamedica@minervamedica.it

I diritti di traduzione, memorizzazione elettronica, riproduzione e adattamento totale o parziale, con qualsiasi mezzo (compresi microfilm e copie fotostatiche), sono riservati per tutti i Paesi.
I contenuti pubblicati nel volume sono di sola responsabilità dell'Autore e non sono garantiti dall'Editore, il quale non è responsabile della precisione o della veridicità di questi contenuti.



PRESENTAZIONE

Ho avuto modo di conoscere il dottor Maurizio Proietti per motivi professionali e, in più occasioni, ho avuto modo di confrontarmi sulle tematiche riguardanti le patologie emergenti; posso garantire per le sue competenze nell'ambito della patologia ambientale: Cenerentola della medicina.

Da qualche decennio, sta aumentando l'incidenza di una serie di patologie statisticamente correlabili all'inquinamento ambientale; una pressione ambientale che non ha precedenti e che peggiora in modo esponenziale con il passare del tempo. Alla luce di quanto appena esposto, probabilmente, è necessario un cambio di paradigma: quello che auspica il Dottor Proietti, che con questo testo sembra invitare i colleghi a prestare maggiore attenzione a questo ambito della medicina.

Con la sua trattazione a trecentosessanta gradi, permette al lettore di comprendere la portata del danno alla salute conseguente all'esposizione agli inquinanti, illustrando come essi attivino quei meccanismi molecolari che stanno alla base delle alterazioni del ciclo della metionina e della metilazione del DNA, e come inneschino processi ossidativi e inducano alterazioni dei gameti maschili... L'autore propone al lettore un'ampia visione nel panorama delle patologie correlabili all'inquinamento.

Interessandomi di neuroscienze, non posso fare a meno di cogliere il nesso tra fisiologia cellulare, inquinamento e patologie, in particolare le neurodegenerative e del neurosviluppo. A partire dalle fasi precoci della vita, in cui i processi proliferativi sono molto attivi, bisogna prestare attenzione agli inquinanti, soprattutto a quelli della filiera alimentare. In questa fase, come ben evidenziato nel libro, avvengono processi importanti a livello del sistema nervoso centrale: differenziazione, migrazione neuronale e pruning sinaptico. Sebbene alcuni dei suddetti processi si protraggano fino all'età adulta, rimane fondamentale il periodo perinatale, per le cosiddette "*Windows of Susceptibility*".

Nel testo sono trattati gli inquinanti più importanti quali i metalli pesanti, i prodotti chimici usati in agricoltura e gli inquinanti atmosferici; per ognuno di essi è descritta l'azione lesiva a carico delle strutture cellulari. È interessante anche comprendere come fanno gli inquinanti ad arrivare nelle strutture nervose dall'apparato respiratorio e gastrointestinale. Si pone attenzione alle alterazioni del ciclo della metionina, dipendenti sia dagli inquinanti, che dai polimorfismi a singolo nucleotide; aspetti fondamentali ampiamente trattati e messi in relazione con le conseguenti patologie. Nel capitolo dedicato all'alterazione della permeabilità intestinale (*Leaky gut syndrome*) è descritto il danno alle giunzioni cellulari causato dagli inquinanti, la disbiosi e le correlazioni con il sistema immunitario.

Non posso fare a meno di parlare della gravidanza, perché il feto condivide l'esposizione materna ai rischi ambientali; gli inquinanti possono causare epimutazioni che, se dovessero interessare le cellule della linea germinale, potrebbero essere trasmesse alle generazioni successive; pertanto l'eredità epigenetica transgenerazionale è una realtà da non sottovalutare. Questo aspetto viene evidenziato molto bene nel libro, così come la correlazione tra inquinamento, genetica (polimorfismi a singolo nucleotide e HLA) e ASD (*autism spectrum disorder*).

I disordini dello spettro autistico (ASD) sono un gruppo eterogeneo di disturbi del neurosviluppo che colpiscono le funzioni cognitive e comportamentali, sono un problema a livello mondiale perché non se ne conosce la causa. L'aumento della prevalenza dell'ASD degli ultimi tempi sembra essere dovuta, solo in parte, all'utilizzo dei nuovi criteri diagnostici e valutativi; importanti fattori responsabili di questa crescente tendenza sono i fattori ambientali ed epigenetici. Non sono stati ancora identificati specifici fattori ambientali e singoli geni coinvolti, sebbene sia stato stimato che almeno 10-15 alleli contribuiscano alla suscettibilità verso la malattia.

Sulla base di quanto esposto, è lecito supporre che la differente combinazione allelica possa determinare una diversa interazione con l'ambiente e quindi una diversa suscettibilità/risposta alla presenza di inquinanti ambientali, aumentando il fattore di rischio per l'ASD.

Lo studio di tipo statistico e bibliografico, a parte in qualche caso, non è in grado di dimostrare una correlazione tra uno o più geni di suscettibilità all'*autism spectrum disorder* (ASD) e gli inquinanti ambientali. Sarebbe opportuno valutare se, e in quale combinazione, diversi polimorfismi a singolo nucleotide possano influenzare la risposta dei soggetti autistici alla presenza di specifici inquinanti ambientali o contaminanti alimentari e, nei soggetti non affetti, aumentare il rischio di malattia. Il Dottor Proietti si prefigge di evidenziare quali geni di suscettibilità all'autismo possono essere i bersagli degli agenti inquinanti.

Anche gli enzimi coinvolti nei processi di detossificazione cellulare (glutazione trasferasi, citocromi...) sembrano associati all'ASD, ma la loro influenza e la possibile interazione con gli inquinanti non è nota né per i soggetti sani, né per i soggetti affetti da ASD. Le uniche evidenze di tipo indiretto riguardano la correlazione tra l'aumento dello stress ossidativo (indice di un danno cellulare) e la ridotta efficienza degli enzimi coinvolti nel ciclo della metionina.

Altri studi hanno dimostrato un'associazione tra il polimorfismo del gene codificante la metilene tetraidrofolato reduttasi (MTHFR) e la predisposizione all'autismo. Nel libro si evidenzia l'importanza di questi geni che controllano i processi metabolici la cui alterazione è associata all'autismo; da questo punto di vista, è fondamentale chiarire se esiste, e quale sia, il contributo di una particolare combinazione allelica e la riduzione di certe capacità metaboliche al rischio di ASD, e quanto gli inquinanti ambientali possano ulteriormente incrementare tale rischio agendo sia a livello genomico che metabolico.

Interessanti anche gli aspetti clinici e gli esami di laboratorio che propongono il monitoraggio dello stato metabolico dei pazienti, e la necessità di individuare biomarkers utili per evidenziare prima, e meglio, le diverse nuove patologie.

Ritengo importante che questo libro venga divulgato perché utile per aggiornare le nozioni di biochimica, immunologia e genetica per mantenere costantemente una pratica clinica consapevole al passo con i tempi.

Professoressa Stefania Lucia Nori
Associato di Anatomia Umana,
Università di Salerno



PREFAZIONE

Esistono ancora, per fortuna, libri che riescono davvero a contribuire alla crescita professionale del lettore attento, libri come questo, in cui avviene una sintesi di più conoscenze, di più discipline, in cui sono formulate ipotesi di studio innovative e destinate ad allargare le vedute dell'intera comunità scientifica.

Molti medici hanno conoscenze limitate di immunologia, materia che si è iniziata a studiare in modo organico nel corso di Laurea in Medicina dalla fine degli anni '80, e ancor meno di epigenetica, di come l'espressione genica può essere regolata da svariati fattori epigenetici; in tanti ignorano – incolpevolmente – cosa siano i polimorfismi genetici a singolo nucleotide, nonostante questi temi siano entrati con urgenza e prepotenza nella necessità del sapere medico quotidiano. Inquinanti, stress, alimenti e altri fattori ambientali possono indurre cambiamenti persistenti nel pool di modificazioni epigenetiche a carico dei cromosomi, alterando così il comportamento di cellule e tessuti. Gli inquinanti chimici possono avere effetti duraturi sullo sviluppo, sul metabolismo e sulla salute anche delle generazioni successive, intervenendo nella modulazione e nel mantenimento delle modificazioni epigenetiche, che sono in grado di influenzare l'espressione genica e il fenotipo. Patologi, pediatri, ginecologi, gastroenterologi, cardiologi, neurologi, psichiatri e neuropsichiatri per primi fanno quotidianamente i conti con quello che Maurizio Proietti ha il merito di illustrare in maniera strategica e articolata: la centralità del ciclo della metionina, individuato come colonna portante della fisiologia cellulare e le sue alterazioni causate dall'azione dell'inquinamento. Il libro fornisce una chiave di lettura unica e complessa di tali fenomeni: illustra il danno prodotto dall'azione degli inquinanti sul ciclo della metionina soprattutto nei soggetti che presentano polimorfismi a singolo nucleotide a carico dei geni coinvolti nel metabolismo delle unità monocarboniose.

Il rapporto diretto tra inquinamento ambientale e alimentare e l'insorgenza di varie patologie è noto da tempo: i rischi maggiori sono a carico dell'apparato respiratorio e di quello cardiocircolatorio. In realtà, quasi tutti gli apparati possono essere coinvolti in patologie sempre più diffuse, dal sistema nervoso, con il rischio di aterosclerosi, malattia di Alzheimer e malattia di Parkinson nell'età adulta e di autismo in età pediatrica; all'apparato renale con il rischio di insufficienza; all'apparato gastrointestinale con il

rischio di patologie infiammatorie croniche e di diabete; sino ai problemi di infertilità, di abortività e di conduzione di una gravidanza fisiologica. Il libro individua il filo rosso che lega patologie diverse: è la comprensione della correlazione tra i polimorfismi genetici a singolo nucleotide, gli inquinanti e le malattie che permette l'adozione di terapie individuali e personalizzate, che consente le scelte alimentari più corrette, che sviluppa sempre di più una medicina centrata sulla persona e non il ricorso a linee guida predefinite standardizzate. È l'esaltazione della complessità della medicina moderna che prefigura l'unicità dei percorsi terapeutici. È una visione innovativa e coraggiosa, frutto dell'impegno civile dell'autore che, preoccupato dal livello e dalla diffusione dei fattori inquinanti, delle ricadute delle patologie ambientali, assiste – come noi – a una sottovalutazione del problema, alla mancata comprensione del rapporto tra inquinamento e molte patologie emergenti, soprattutto di quelle neurodegenerative e del neurosviluppo.

Questo libro non è solo un primo tentativo di fornire ai medici e ai lettori quel seme della curiosità scientifica che dovrebbe guidare l'approfondimento e lo studio volto a migliorare la pratica professionale quotidiana (non mancano esempi pratici e suggerimenti utili), è in realtà un punto di partenza per una nuova visione della patologia ambientale che ormai rientra tra le epidemie silenziose del nostro secolo e che, se non si continuerà a lavorare nel solco tracciato da Maurizio Proietti, non troverà una pronta ed efficace soluzione.

Dottor Eugenio Serravalle

Pediatra

*Presidente dell'associazione di studi
e informazione sulla salute (AsSIS)*

INDICE

Capitolo 1	1
Genetica e metilazione	
Un po' di storia	2
Alcuni meccanismi che determinano modifiche del DNA	4
Inquinamento, espressione genica e mutagenesi ambientale	5
Polimorfismo a singolo nucleotide	7
Influenza dell'ambiente sui geni soggetti a imprinting e silenziamento genico	9
Meccanismi molecolari epigenetici	12
Major histocompatibility complex (MHC)	13
Cambiamenti genetici transgenerazionali e inquinamento	17
Capitolo 2	20
Ciclo della metionina	
Omocisteina	21
Aminoacidi e proteine	24
S-adenosil-L-metionina	26
Transulfurazione	28
Rimetilazione	29
Capitolo 3	33
Vitamine e ciclo della metionina	
Nuove conoscenze, vecchia malattia	35
Fattore intrinseco, transcobalamina, aptocorrina	37
Vitamina B2	48
Vitamina B6	49
Folato	50
Vitamina D	55
Capitolo 4	63
Polimorfismi genetici a singolo nucleotide	
Gene MTHFR	68
MTR ed MTRR	69
Metionina adenosil transferasi (MAT)	72
MAT2A	72
Angiotensin I converting enzyme (ACE)	74
AHCY o SAHH	75
Tetraidrobiopterina (BH4), Dihydropteridine reductase (DQPR), NO sintasi (NOS) ...	76

ACAT1 e ACAT2	81
BHMT	85
CBS	86
COMT	88
MAO	90
PEMT	93
MTHFD1	96
SHMT1 e SHMT2	97
Superossido dismutasi (SOD)	98
SUOX	101
Gene Ornithine Carbamoyltransferase (OTC)	103
Recettore della vitamina D (VDR)	104
TCN1 e TCN2	109
Presenza di più polimorfismi	111
Polimorfismi MTHFR e PON	114
Polimorfismi ACAT e PEMT	114
<hr/>	
Capitolo 5	121
Inquinamento e salute	
Enzimi di fase I	122
Enzimi di fase II	123
Promutageni e mutageni	123
Inquinanti organici persistenti (POPs)	124
Inquinamento atmosferico	128
Contaminazione delle acque	130
Tossicità da metalli pesanti	131
Vie di trasporto degli inquinanti	135
Rifiuti, incenerimento e rischi per la salute	137
Alluminio	139
Arsenico	140
Mercurio	142
Analisi minerale tissutale o mineralogramma	145
Zinco e rame	146
Selenio	148
Manganese	148
<hr/>	
Capitolo 6	154
Glutazione e glutazione transferasi	
<hr/>	
Capitolo 7	161
Candace Pert e i recettori cellulari	
Gli albori dell'immunologia	165
Biochimica sistema immunitario, endocrino e nervoso, secondo Candace Pert	167
<hr/>	
Capitolo 8	170
Inquinamento e permeabilità intestinale	
Immunità regionale	171
Giunzioni intercellulari	173
Giunzioni aderenti	174
Giunzioni strette	174

Sistema nervoso enterico (SNE).....	175
Cellule gliali enteriche.....	177
Permeabilità e batteri	180
Tolleranza immunologica: celiachia e sensibilità al glutine	184
Ruolo delle connessine e gap junctions	186
Citochine e barriere epiteliali	187
Allattamento e giunzioni cellulari	190
Permeabilità e autoimmunità	192
Intestino e ASD.....	193
Eosinofili e apparato gastrointestinale.....	196
Capitolo 9	199
Patologie e ciclo della metionina	
Infertilità e aborto	199
Omocisteina e gravidanza	201
Polimorfismi a singolo nucleotide e Infertilità.....	206
Patologia tromboembolica e malattie cardiovascolari	207
Disfunzione erettile	211
Insufficienza renale	212
Diabete e ciclo della metionina	214
Malattie infiammatorie croniche intestinali	216
Capitolo 10	220
Malattie neuropsichiatriche, ciclo della metionina e stress ossidativo	
Inquinanti e mitocondrio.....	225
Malattie mitocondriali e genetica	227
Degenerazione subacuta combinata	228
Depressione e ciclo della metionina	231
Aterosclerosi, malattia di Alzheimer e malattia di Parkinson	232
Polimorfismi a singolo nucleotide e autismo.....	235
Il problema dei metalli tossici nell'ASD	246
Capitolo 11	251
Esami di laboratorio e ciclo della metionina	
Perché richiedere gli esami	251
Analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide.....	253
Aminoacidi urinari, plasmatici e indicatori del ciclo della metionina.....	256
Leucina, isoleucina, valina	259
Istidina	259
Glutamina e glutammato	259
Cistina, cisteina, glicina	260
Cistationina beta sintasi	260
Bioppterina e neopterina.....	261
Analisi minerale tissutale o mineralogramma	262
Lipidomica di membrana.....	263
Acidi organici	265
Test della permeabilità intestinale	267
Appendice	269



INTRODUZIONE

Viviamo in un mondo civilizzato e in pieno benessere economico, pertanto, questa dovrebbe essere una condizione ideale per poter vivere in buono stato di salute; però alcune domande sorgono spontanee: perché ci ammaliano di più? Perché viviamo più a lungo e nel contempo si registra un progressivo aumento delle malattie cronic-degenerative, in particolare della patologia tumorale? Nei paesi industrializzati, ma in quest'ultimo periodo anche nei paesi in via di sviluppo, l'impatto delle nuove tecnologie e delle scelte industriali stanno modificando gli stili di vita: c'è una alterazione del rapporto tra l'uomo e l'ambiente. Tale alterazione si traduce in aumento delle malattie, in particolare quelle cronic-degenerative che sono sostenute da stress ossidativo. Sebbene l'organismo possieda un complesso sistema di omeostasi redox (ossido-riduttivo), a volte potrebbe non essere sufficiente perché è compromesso dagli inquinanti. A soffrirne maggiormente è la catena respiratoria a livello mitocondriale.

Negli ultimi decenni l'ambiente in cui viviamo è cambiato, mentre la genetica resta la stessa, infatti, per osservare modificazioni a carico dei geni ci vogliono moltissimi anni. Non mi riferisco alle modificazioni epigenetiche. I nostri geni, che erano ben integrati con l'ambiente fino a qualche decennio fa, attualmente potrebbero non "reggere l'impatto" a causa dei livelli di inquinamento raggiunti; forse ci vorranno decenni prima che si adattino a queste nuove condizioni ambientali. A pagare il prezzo più alto saranno soprattutto gli individui più sensibili. Sappiamo che solo lo 0,1% delle sequenze del nostro DNA rappresenta la variabilità individuale. Ciò è evidenziabile grazie alle diverse forme di variabilità nucleotidica: sequenze Alu, microsatelliti, regioni moderatamente ripetute, e in particolare i polimorfismi a singolo nucleotide. Queste variazioni costituiscono il fingerprint genetico individuale che può aiutare a predire come un soggetto risponderà ai fattori ambientali come gli inquinanti, i microrganismi patogeni e non, ma anche ai farmaci. Poiché il gene si esprime in rapporto ai fattori ambientali interni ed esterni, sono sufficienti anche piccole modificazioni per causare cambiamenti epigenetici capaci di indurre l'insorgenza di patologie nel lungo termine.

L'ambiente influenza l'espressione genica e le modifiche che rapidamente si susseguono a livello ambientale stanno dettando le regole anche alla scienza. Infatti, se fino

a qualche decennio fa si parlava solo di *mutagenesi chimica*, oggi è indispensabile, ai fini del progresso scientifico e della ricerca, parlare di *mutagenesi ambientale*.

L'informazione genetica si esprime attraverso la sintesi proteica, i processi di riparazione fanno sì che possa mantenere la sua attività senza variazioni; con la replicazione può essere trasmessa alle generazioni successive, ma tutto questo oggi non è più garantito. L'inquinamento ha cambiato le regole del gioco!

Alla base del danno delle strutture cellulari c'è lo stress ossidativo. Quelle che ne risentono maggiormente sono il DNA, il RNA e la membrana citoplasmatica; senza quest'ultima, anche a detta di Lipton, la sopravvivenza della cellula è impossibile. Infatti, su di essa sono presenti gli innumerevoli recettori che servono al "dialogo" con altre cellule. Ai recettori ho dedicato un capitolo particolare, che non è tecnico come gli altri ma fa riferimento alla storia di colei che può essere considerata la "madre dei recettori" e che ha iniziato il percorso in questo ambito: Candace Pert.

Partendo dal concetto che il ciclo della metionina è la colonna portante della fisiologia cellulare, vedremo le ricadute negative dovute agli inquinanti, soprattutto se sono presenti i polimorfismi a singolo nucleotide a carico dei geni coinvolti nel metabolismo delle unità carboniose. Lo scopo del libro è quello di dare una visione d'insieme sulla correlazione tra i polimorfismi genetici a singolo nucleotide, gli inquinanti e le malattie. È una visione gestaltica che prevede l'utilizzo della genomica, perché solo a queste condizioni saremo in grado di fare una diagnostica e una terapia incentrata sulla persona, che in piena epoca delle omiche è auspicabile. Saremo in grado di decidere, ad esempio, quando è il caso di somministrare glutazione o quando la sua somministrazione potrebbe essere addirittura controproducente. Saremo in grado di valutare la migliore terapia in caso di stress ossidativo, se un soggetto può effettuare la chelazione per i metalli pesanti o no. Saremo associare a una adeguata integrazione una dieta opportuna, come ad esempio nei soggetti che presentano polimorfismi a singolo nucleotide del gene cistationina beta sintasi, che dovrebbero limitare l'assunzione di zolfo perché c'è un aumento dei livelli di solfiti e solfati. I soggetti appena citati, devono tenere presente che il tutto potrebbe essere aggravato dalla compresenza del polimorfismo a singolo nucleotide del gene solfito ossidasi. Solo con la visione d'insieme dei polimorfismi genetici a singolo nucleotide ci renderemo conto anche di come gli inquinanti, che hanno il comune denominatore della tossicità, causano danno in maniera diversa nei soggetti con assetti genetici diversi. Il tutto va osservato attraverso una "lente" particolare: la permeabilità intestinale, che forse attualmente è la "madre" di molte malattie emergenti. A questa problematica sarà dedicato uno specifico capitolo, che ci permetterà di comprenderne gli aspetti fondamentali.

Nella prima parte del libro si affronterà il discorso della metilazione, importante meccanismo epigenetico. L'epigenetica sta acquisendo sempre più importanza e oggi non è più considerata una parte della genetica, ma una "branca" a se. Si passerà a parlare di inquinanti (almeno di quelli più importanti perché è impossibile trattarli tutti), del loro impatto sulla salute e dei meccanismi che l'organismo mette in campo per difendersi da questo "attacco". Si parlerà dell'importanza delle vitamine per il ciclo della metionina, delle sostanze ad azione antiossidante e del loro ruolo nei meccanismi di difesa cellulare. Le alterazioni a carico del ciclo della metionina e la conseguente produzione anomala di molecole importanti, possono essere considerati il comune denominatore di molte malattie, soprattutto quelle emergenti. Si passeranno in rassegna i principali

polimorfismi a singolo nucleotide, e infine, le patologie che più risentono degli squilibri del ciclo della metionina. Si discuterà delle patologie in ambito gastroenterologico, ginecologico, cardiologico e neurologico con particolare riguardo all'autism spectrum disorder (ASD). L'ASD è fonte di preoccupazione a livello mondiale, perché ad oggi, non se ne conoscono i meccanismi patogenetici.

Non mancherà un accenno agli esami di laboratorio più importanti, che potranno dimostrarsi utili per la diagnostica. Devo precisare che a volte si tratteranno argomenti che non è possibile far rientrare nel perimetro di un capitolo: ad esempio se si parla di inquinanti come il mercurio è necessario accennare ad alcuni aspetti della sua tossicità anche quando viene trattato il polimorfismo a singolo nucleotide del gene cistationina beta sintasi. Per questo motivo a volte alcune informazioni saranno ripetute, ma sono necessarie al contesto. A volte sono riportati dati che sembrano avulsi dal contesto, e forse lo sono, ma sono dati utili e interessanti da acquisire perché offrono uno spunto per la riflessione e l'approfondimento.

Una parte importante è quella dedicata ai geni coinvolti nel ciclo della metionina, che ci permetterà di comprendere il funzionamento del suddetto ciclo in rapporto allo stress ossidativo. Sappiamo che lo stress ossidativo determina lesioni della membrana cellulare e di conseguenza arreca danno anche ai recettori, questi ultimi sono fondamentali per la comunicazione cellulare.

Parlando del ciclo della metionina, che è un gioco di perfetti equilibri biochimici, si avrà modo di analizzare i polimorfismi a singolo nucleotide in una visione di insieme che ci consentirà di rilevare le problematiche connesse alle loro possibili combinazioni. Questo risulterà utile per gestire una terapia ad personam: la cosiddetta medicina personalizzata, di cui oggi tanto si parla. Quanto appena accennato è un approccio fondamentale per gestire patologie complesse come l'ASD, la permeabilità intestinale ecc.

Nel capitolo dedicato ai polimorfismi a singolo nucleotide è riportata una mappa che ha la funzione di guida. Ricorda vagamente le mappe geografiche che passo dopo passo fanno comprendere il percorso da intraprendere. Nel nostro caso è il percorso biochimico della fisiologia cellulare.

La mappa, insieme a un linguaggio il più semplice possibile ma non elementare e che mantiene il rigore scientifico, è necessaria per rendere accessibile la lettura del testo non solo ai medici ma anche a persone di buon livello culturale. È un libro con chiaro intento didattico-scientifico e non divulgativo in senso stretto, ma in molti saranno in grado di farsi un'idea su cosa sta succedendo attualmente al nostro organismo e quali sono le dinamiche a livello biologico. Ci si potrà rendere conto della gravità del momento.

La mia considerazione finale è la seguente: è urgente trovare le soluzioni, uso il plurale perché non è sufficiente una sola soluzione, per abbattere o perlomeno diminuire il tasso di inquinamento, altrimenti sarà difficile arginare questo aumento esponenziale delle malattie. Una soluzione sicuramente arriverà dalla Fisica: l'avremo quando si capirà l'importanza delle reazioni nucleari deboli; ma questo è il mio modo di vedere da "appassionato" della Fisica. Basta guardarsi intorno, senza interessi "particolari", e ci accorgeremo che la tecnologia già è tra di noi. È, inoltre, fondamentale un approccio interdisciplinare che veda coinvolte più figure professionali.

In questo capitolo parleremo dei processi di metilazione e della loro correlazione con la genetica e con l'epigenetica, dell'importanza della metilazione dei geni e dell'influenza dell'epigenetica su alcune patologie, cancro compreso. Il ciclo della metionina è strettamente correlato alle reazioni di transmetilazione e a molte altre reazioni catalizzate dalle metiltransferasi. Come avremo modo di vedere in seguito, assume notevole importanza la S-adenosil metionina (SAM), che attraverso la cessione del gruppo CH_3 permette questo tipo di reazioni. Tra le più importanti dobbiamo evidenziare quelle che avvengono negli acidi nucleici, oltre a quelle necessarie per il mantenimento dell'integrità delle membrane cellulari e delle componenti cellulari del sistema immunitario.

Un accenno all'argomento "cancro" è necessario, non solo perché costituisce un grande problema per la scienza, ma è utile per approfondire alcuni aspetti della genetica e per comprendere come alcuni inquinanti possano determinare l'insorgenza di malattie attraverso lo stress ossidativo. La scienza considera il cancro la conseguenza di un incidente genetico scatenato da mutazioni sequenziali, in parte casuali e in parte indotte da fattori genotossici che agiscono aumentando l'indice di proliferazione, la riattivazione delle telomerasi e il blocco dell'apoptosi, permettendo così la selezione e la trasmissione generazionale del clone. Una delle caratteristiche del cancro è la disregolazione del profilo dell'espressione genica e il conseguente sovvertimento delle vie di trasduzione. Oggi il paradigma cancerogenetico dominante è la cosiddetta Teoria Mutazionale Somatica (SMT).

Fu Nowell, nel 1976, il primo a dare una definizione scientifica del cancro come malattia genetica: "si propone che la maggior parte dei tumori derivi da una singola cellula e che la progressione tumorale sia il risultato di una instabilità genetica acquisita all'interno del clone originale, che consente la selezione sequenziale delle linee cellulari più aggressive. Le popolazioni di cellule tumorali appaiono geneticamente più instabili rispetto a quelle normali, forse per attivazione di specifici loci genici". Il principale limite del paradigma della Teoria Mutazionale Somatica risiede nel ruolo eminentemente passivo assegnato al DNA come meta di agenti genotossici in grado di provocare danni genetici di tipo stocastico.

Fortunatamente oggi le cose stanno cambiando. Grazie a studi più avanzati che ci fanno considerare obsoleto il paradigma riduzionista e gene-centrico, siamo stimolati a

prendere in considerazione nuovi modelli di genoma. Questi modelli devono essere visti all'interno di uno più dinamico che tenga presente l'influenza dell'ambiente nell'induzione e nella reiterazione dello stress genomico, ambiente che è sempre più responsabile dell'aumento esponenziale di patologie cronico-degenerative e neoplastiche. In base a quanto appena esposto è fondamentale considerare la correlazione tra epigenetica e metilazione; in poche parole: genetica e metilazione "viaggiano insieme". Cercherò di fornire anche le nozioni necessarie alla comprensione del danno derivante dagli inquinanti chimici e altri tipi di xenobiotici, anche se non è questa la sede per trattare in maniera esaustiva il tema dell'inquinamento.

UN PO' DI STORIA

Quando si parla di genetica il primo nome che torna alla mente è quello di Gregorio Mendel che certamente è stato il pioniere di questa affascinante branca della biologia. Come periodo storico ci si riferisce alla seconda metà dell'Ottocento. È stato importante anche il ruolo di altri scienziati suoi contemporanei, come Fredrich Miescher che isolò la nucleina, che oggi conosciamo come DNA. Oscar Hertwig intuì e dimostrò il ruolo fondamentale del nucleo per la divisione cellulare. Si dovette aspettare l'inizio del XX secolo per la prima descrizione di una malattia genetica da parte di Garrod e Bateson; da allora molti altri scienziati hanno contribuito allo sviluppo di questa branca della scienza. Per motivi storici citiamo, Watson e Krick che nel 1953 proposero il modello a doppia elica del DNA. Per quanto concerne le acquisizioni nel campo della genetica, dobbiamo molto alla compianta Barbara McClintock, che come già accennato, si interessò alla ricombinazione genetica del mais e riuscì a dimostrare lo scambio fisico di parti di cromosomi omologhi. Pose l'attenzione sui comportamenti anomali dei cromosomi del mais, notò che alcune cariossidi non avevano colorazione uniforme, ma avevano macchie di colore sul fondo incolore. Le conoscenze dell'epoca si limitavano ad affermare che i geni del mais potevano mostrare solo due alleli: l'allele C che dava la colorazione viola e l'allele mutato c, che dava mais non colorato. Fu Lei a scoprire che tale mutazione era dovuta a un elemento mobile, oggi chiamato trasposone, che in caso di presenza nel gene C lo muta in c, rendendo così impossibile la produzione del pigmento.

La nascita della genetica permise di comprendere fenomeni fino ad allora interpretati solo in termini metafisici, e gettò le basi della biologia molecolare che a sua volta può essere considerata la pietra angolare della scienza che iniziò a studiare la comunicazione cellulare e sub-cellulare. Dopo qualche decennio il dogma centrale della biologia esposto da Crick, nel quale il gene è considerato "motore immobile" e stampo univoco per ogni molecola biologica, vacillò e cadde perché era un modello riduzionista e meccanicista. Secondo il "dogma centrale della biologia molecolare", formulato da Crick alla fine degli anni '50 e precisato nel 1970, l'informazione genetica del DNA è accuratamente trascritta in RNA che genera una proteina. Crick non esclude che ci potessero essere relazioni inverse tra RNA e DNA e perfino tra DNA e proteine, ma queste, se esistessero, sarebbero "relazioni speciali", eccezionali. Se fossero dimostrabili le altre relazioni, "ciò scuoterebbe l'intera base intellettuale della biologia molecolare". La vecchia concezione "preformista" ipotizza la presenza di tutta l'informazione necessaria allo sviluppo dell'organismo già nell'ovulo fecondato, questo implica che il genoma è la sede

del “progetto” da cui sorgerà una sola configurazione, come scrisse Jacques Monod ne “Il caso e la necessità”. L'epistemologia di questo paradigma è chiara: la vita sta nella sequenza delle basi del DNA e il suo sviluppo avviene nella direzione gene → proteina e non viceversa. Il fenotipo non viene preso in considerazione e non si dà importanza ai comportamenti e alle influenze dell'ambiente.

La DNA polimerasi (RNA-dipendente) chiamata anche trascrittasi inversa o retrotrascrittasi, è un enzima appartenente alla classe delle transferasi. È un enzima in grado di sintetizzare DNA come le DNA polimerasi, ma è in grado di utilizzare il RNA come stampo di partenza. È l'enzima dei retrovirus.

Oggi che sappiamo molto sia sul genotipo che sul fenotipo, possiamo affermare che un genotipo può dare origine a più fenotipi, pertanto, da una stessa sequenza genetica possono scaturire organismi diversi. Lo “splicing alternativo” ha demolito il dogma che affermava: “ad un gene deve corrispondere una proteina”. Lo ha demolito perché dallo stesso gene, e in dipendenza della sequenza genica attivata, è possibile produrre proteine diverse. Da una visione lineare gene-carattere fenotipo, un gene → un fenotipo, si passa a una visione eterogenea, secondo la quale un gene può influenzare più caratteri, o più geni concorrono a determinare un carattere (relazione molti a uno) o più geni concorrono a determinare più caratteri (relazione molti a molti). Il movimento RNA → DNA in realtà è possibile e avviene. Infatti, è stata dimostrata l'esistenza di RNA che fungono da stampo per la sintesi del DNA: ne è un esempio la “trascrittasi inversa”.

All'inizio del terzo millennio sono stati scoperti dei piccoli RNA chiamati interferenti, sono molecole che invece di regolare la sintesi delle proteine distruggono altri RNA e sono addirittura capaci di bloccare, “silenziare”, il gene che li ha prodotti. Questi RNA non codificanti (ncRNA), sono più di un migliaio e tutti diversi, controllano l'espressione genica e decidono se, in base all'informazione espressa da un gene, nascerà la relativa proteina. L'informazione genetica si esprime quindi attraverso la sintesi proteica e i processi di riparazione fanno sì che possa mantenere la sua attività senza variazioni, e con la replicazione, possa essere trasmessa alle generazioni successive. È fondamentale che non intervengano “elementi di disturbo” che potrebbero alterare il suddetto processo.

Lo stato più avanzato della ricerca oggi prevede lo studio delle mutazioni tautomeriche del DNA. Questo tipo di mutazione sembra essere importante nell'invecchiamento e nella formazione delle neoplasie. In biochimica esiste il concetto di trasformazione tautomerica, in parallelo con la trasformazione isomerica, ma questi sono concetti che riguardano solo lo stadio finale della mutazione la quale origina da un fenomeno fisico detto “effetto tunnel di un protone nel DNA”. Viceversa esiste il concetto matematico di “isometrie del DNA”, esplorato da vari matematici, il quale tiene conto della simmetria ad elica del DNA. Unendo tali concetti, fisico, chimico e matematico, tenendo conto della eventuale catalogazione delle neoplasie in relazione alla parte di DNA anomalo, ed infine, usando gli angoli di torsione ed inclinazione nel DNA si può definire l'origine fisica delle mutazioni del DNA dovuta alla deformazione della struttura. Questo è in analogia con quanto viene descritto nel fenomeno delle “torsioni” a causa delle radiazioni ionizzanti, per cui, oltre una torsione limite, si ha una mutazione puntiforme del DNA.

Chi volesse approfondire questi argomenti, che rappresentano l'avanguardia sul fenomeno delle mutazioni tautomeriche del DNA come conseguenza dell'effetto tunnel nei sistemi biologici, deve consultare i lavori del biofisico svedese Per-Olov Lowdin.

Lavori utili e consigliati sono anche i seguenti:

- Matta CF. Quantum Biochemistry: Electronic Structure and Biological Activity. Weinheim: Wiley-VCH; 2014.
- Rabi M. Quantum Mechanics: In Physics and Chemistry with Applications to Biology. Newi: PHI Learning; 2011.
- Cooper WG. Roles of evolution, quantum mechanics and point mutations in origins of cancer. Cancer Biochem Biophys 1993;13:147-70.

ALCUNI MECCANISMI CHE DETERMINANO MODIFICHE DEL DNA

Metilazione del DNA

È il meccanismo epigenetico meglio caratterizzato nei mammiferi e avviene quasi esclusivamente a livello della citosina all'interno dei dinucleotidi CpG, detti anche *isole CpG*; converte la citosina in 5-metilcitosina. Dopo la replicazione del DNA, l'enzima DNA metiltransferasi (DNMT) provvede al ripristino della "segnatura" metilica nei filamenti duplicati garantendo così il perpetuarsi dell'informazione epigenetica alle cellule figlie, è questo un esempio di eredità epigenetica mitotica. L'attivazione genomica avviene attraverso l'ipo-metilazione progressiva e globale del DNA e l'iper-metilazione distrettuale a carico delle isole CpG (generalmente ipo-metilate) del promotore dei geni oncosoppressori. L'ipo-metilazione globale del DNA favorisce l'instabilità genomica e cromosomica perché destabilizza i centromeri e favorisce la condizione di aneuploidia. L'ipermetilazione selettiva delle isole CpG blocca l'azione di numerosi geni oncosoppressori come il p21, p14, p15, p16, p73 e Rb, geni che sono deputati al controllo dei programmi di proliferazione cellulare.

Abbiamo visto come la metilazione interessi prevalentemente la citosina, tant'è che si è parlato addirittura di quinta base perché la citosina metilata ha proprietà diverse dalla citosina non metilata. Tra l'altro, la citosina può essere metilata solo se è adiacente alla guanina, questo ovviamente fa pensare a precise motivazioni di ordine chimico e/o fisico. In altre parole: possono essere metilate solo le coppie "CG" che nel genoma non sono distribuite a caso, ma si presentano a gruppi. Da qualche tempo si sta cercando di mappare tutte le citosine del genoma umano, un'impresa complicata perché non esiste un solo epigenoma, infatti, ogni tipo cellulare ha il suo epigenoma peculiare e distinto. La situazione si complica ulteriormente, perché i processi di metilazione sono soggetti alla pressione ambientale, di conseguenza ci saranno variazioni all'interno di ogni epigenoma. Lo scopo del progetto è quello di individuare uno schema di metilazione tipico per ogni tipo cellulare, il fine ultimo è verificare se esiste quello correlato al cancro. L'auspicio è di arrivare a determinare "gli epigenomi", così come è stato fatto per il genoma. L'epigenomica deve andare oltre gli schemi di metilazione, deve infatti comprendere le modificazioni fisiche della cromatina determinate dai legami con gli istoni. La metilazione, il rimodellamento della cromatina e i RNA contribuiscono alla regolazione epigenetica, in particolare nel differenziamento cellulare.

I. Rimodellamento della cromatina tramite la modificazione degli istoni

La cromatina presenta diversi gradi di compattazione. La conformazione è regolata da una serie di modificazioni dei residui della lisina nelle code istoniche attraverso processi di acetilazione (tramite l'enzima istone acetiltransferasi – HAT), di deacetilazione (tramite l'enzima istone deacetilasi – HDCA), di metilazione, di fosforilazione, ubiquitinazione e altro. Alcuni meccanismi non sono ancora del tutto compresi nelle loro reciproche interazioni. L'acetilazione rende la cromatina più accessibile perché ne favorisce la demetilazione.

II. Proteine leganti il DNA

Fungono da fattori di trascrizione e sono fondamentali per la regolazione dell'espressione genica. Contrariamente a quanto si pensa, cioè che tutti i meccanismi epigenetici coinvolgano la modificazione covalente del DNA o delle proteine istoniche, i fattori di trascrizione con la loro attività auto regolativa rendono possibile l'ereditarietà mitotica e potenzialmente meiotica dell'espressione genica.

III. RNA non codificanti

Sono piccoli RNA detti small interfering RNA (siRNA) o microRNA, la cui finalità non è quella di tradurre l'informazione genetica in proteine, bensì di distruggere copie anomale di RNA messaggero (mRNA) dal quale sono derivati e, al tempo stesso, silenziare il gene che ha prodotto il mRNA anomalo attraverso la sua metilazione. Di recente sono stati scoperti altri meccanismi con cui i RNA non codificanti (ncRNA) partecipano all'epigenesi a vari livelli influenzando le caratteristiche del fenotipo.

INQUINAMENTO, ESPRESSIONE GENICA E MUTAGENESI AMBIENTALE

Generalmente le mutazioni avvengono con le stesse modalità in tutti gli organismi viventi. Poiché negli organismi pluricellulari le mutazioni si verificano sia nelle cellule somatiche che in quelle germinali, possono esserci conseguenze diverse a seconda dei casi. Una qualsiasi cellula somatica dell'individuo, se mutata, quando si replica dà origine a un clone cellulare mutato e, poiché nello stesso tessuto possono essere presenti cellule normali e cellule mutate, si ha in questo caso un mosaico genetico. La differenza fra le cellule somatiche e le germinali dipende dal meccanismo che preserva le porzioni telomeriche. Se una mutazione interessa i gameti, e questi partecipano alla fecondazione, tutte le cellule embrionali derivanti presenteranno la mutazione e il soggetto che ha ereditato questo tipo di mutazione può trasmetterla alle generazioni successive.

Anche nello zigote si osservano processi di crescita e di differenziamento controllati dall'interazione del genoma con l'ambiente, questo porterà allo sviluppo di un organismo che andrà incontro a una serie di cambiamenti fenotipici peculiari. Per avere un'idea precisa di come si sviluppa un organismo lo dobbiamo immaginare come un network di percorsi metabolici interagenti tra di loro e con l'ambiente, quest'ultimo ha la capacità di influenzarli attraverso la modifica dell'espressione genica.

I principali processi coinvolti, e che interagiscono tra loro per determinare lo sviluppo, sono: la replicazione genetica, il differenziamento cellulare e la conseguente organizzazione in tessuti specifici, oltre ai processi di crescita. Lo studio di questi meccanismi è possibile nei modelli animali perché i geni possono essere studiati anche variando le condizioni ambientali, cosa che per motivi etici, ovviamente, non può essere fatta sull'uomo.

Con la scoperta degli *short heterochromatic RNA* (shRNA) è stato osservato che le molecole di RNA regolano lo stato della cromatina, pertanto, possono modificare il DNA e di conseguenza l'espressione genica. Gli shRNA vanno ad aggiungersi alle proteine già conosciute per questa funzione: le deacetilasi istoniche e gli enzimi di metilazione del DNA.

Oggi sappiamo che i cambiamenti nel genoma non sono solo dovuti alle classiche mutazioni stocastiche, ma sono prevalentemente determinati dall'epigenesi. Questa marcatura dell'epigenoma può essere ereditata nella mitosi e nella meiosi (ereditarietà trans-generazionale), in questi processi la metilazione ha un ruolo fondamentale.

Durante le diverse fasi dello sviluppo i geni garantiscono, in dipendenza dei fattori ambientali coinvolti, la realizzazione di un particolare fenotipo; in altre parole il fenotipo è la somma del genotipo e delle influenze dell'ambiente. L'ambiente può essere considerato una vera e propria variabile. I geni determinano solo il potenziale sviluppo del fenotipo, la cui realizzazione dipende dall'influenza dell'ambiente e dall'interazione con altri geni. A riprova di quanto appena esposto è sufficiente prendere come esempio i fratelli e i gemelli, nei quali il genotipo è comune ma il fenotipo è diverso. Anche all'interno di alcuni nuclei famigliari si può osservare la presenza di una patologia in un figlio, ma non in altri, ciò è spiegabile con il fenomeno della penetranza.

Possiamo considerare la genetica di un organismo come un computer con il suo hardware (genotipo) e il suo software (fenotipo): il fenotipo è l'insieme delle caratteristiche osservabili del genotipo. La distinzione tra genotipo e fenotipo fu fatta per la prima volta all'inizio del secolo scorso, da un botanico danese che definì il fenotipo: l'indicatore imperfetto del genotipo.

Il genotipo può esprimere fenotipi diversi, così come un fenotipo può derivare da genotipi diversi.

Nella concezione classica della malattia genetica si afferma che c'è un danno a uno specifico gene e di conseguenza si ha un fenotipo corrispondente. Nelle patologie multifattoriali tuttavia non è così. Una descrizione degna di nota è quella del dottor Preve: "L'endofenotipo è un indizio delle basi genetiche della stessa malattia, deve avere le seguenti caratteristiche: deve essere ereditabile, associato con la malattia nella popolazione, indipendente dallo stato di malattia, co-segregato all'interno delle famiglie, ritrovarsi in familiari affetti e non nella famiglia".

La penetranza è la frequenza della manifestazione di un genotipo, mentre l'espressività è il grado della manifestazione fenotipica di un allele o di un genotipo penetrante in un individuo. La penetranza è totale nel caso in cui tutti gli omozigoti recessivi manifestano un determinato fenotipo e tutti i dominanti un altro fenotipo. Se non tutti gli individui con un determinato genotipo manifestano il fenotipo corrispondente, la penetranza è incompleta.

Le modifiche che rapidamente si stanno susseguendo a livello ambientale stanno dettando le regole anche alla scienza. Infatti, se fino a qualche decennio fa si parlava

solo di mutagenesi chimica, oggi è indispensabile, ai fini del progresso scientifico e della ricerca, parlare anche di mutagenesi ambientale. Le prime osservazioni scientifiche in questo ambito le fece la dottoressa Auerbach sulla *Drosophila*, nella quale riuscì a rilevare gli aumenti della frequenza delle mutazioni indotte chimicamente. In sintesi: ogni individuo ha le proprie caratteristiche dette “tratti” o caratteri, alcuni dei quali ereditabili e controllati dai geni; la costituzione genetica (genotipo) interagendo con l’ambiente esprime il fenotipo.

POLIMORFISMO A SINGOLO NUCLEOTIDE

Per polimorfismo genetico a singolo nucleotide (SNP) si intende una variazione delle sequenze nucleotidiche del DNA con frequenza superiore all’uno per cento. Quando la frequenza è inferiore a tale valore arbitrario si parla di varianti genetiche rare. Possiamo distinguere tre classi principali:

- polimorfismi di singoli nucleotidi (single nucleotide polymorphism, SNP);
- corte ripetizioni in tandem (*short tandem repeats*, STR);
- numero variabile di ripetizioni in tandem (*variable numbers of tandem repeats*, VN-TRs).

In questa sede parleremo solo dei primi. I polimorfismi genetici a singolo nucleotide (SNPs) sono utilizzati per costruire le mappe delle differenze genetiche. Un SNP è un marcatore del DNA consistente in una alterazione che interessa una singola base in un determinato sito: prende il nome di locus del polimorfismo. Questi loci abbondano nel genoma umano, mediamente uno ogni 1.000 bp e raramente il set di alleli interessati dai SNPs su un cromosoma è riassorbito dalla ricombinazione. In altre parole se si eredita l’allele 1 di X (variabile)-A (X-A1) e l’allele di X-B(X-B1) paterno, e l’allele 2 X-A (X-A2) e l’allele di X-B(X-B2) materno, nella progenie troveremo molto più facilmente X-A1 e X-B1, o X-A2 e X-B2 perché è improbabile un nuovo assortimento dei SNPs. Un polimorfismo C lontano da A e B, rende difficile la previsione in termini di ereditarietà in relazione ad A e B.

La ricombinazione genetica avviene con maggior frequenza nelle regioni “hot spot”, mentre il contrario è osservabile nelle regioni “cold spot”. Essendo queste regioni piccole, i loci polimorfici di un aplotipo si troveranno vicini costituendo un gruppo di SNPs geneticamente concatenati. Nell’uomo, a oggi, sono stati analizzati oltre 13 milioni di SNPs e 500.000 tag SNPs. L’analisi di questi ultimi consente di prevedere come saranno ereditati tutti i SNPs di ciascun aplotipo. Oggi è possibile determinare il genotipo per migliaia di loci dei SNPs grazie ai microarray a DNA.

La mappa degli aplotipi HapMap descrive in maniera dettagliata e completa tutti gli aplotipi conosciuti, compresa la loro localizzazione nei cromosomi. Si tratta di un aspetto importante perché due aplotipi vicini, separati da una regione a bassa ricombinazione, saranno ereditati insieme; lo stesso vale per regioni ad alta ricombinazione.

Il completamento del Progetto Genoma ha consentito di stabilire il numero dei geni codificanti (circa 20.000) e di rilevare che oltre il 50% del genoma è rappresentato da sequenze ripetute dette “DNA spazzatura”, la cui funzione non è ancora del tutto conosciuta.