

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA PREVENZIONE

XXII CICLO (2006-2009)

**Coordinatore:**

**Chiar.mo Prof. Antonio Mutti**

**Polimorfismi metabolici: applicazioni nello studio della  
patologia multifattoriale e nel monitoraggio biologico  
dell'esposizione a xenobiotici**

**Tutor:**

**Chiar.mo Prof. Antonio Mutti**

**Dottorando**

**Giuseppe De Palma**

## **INDICE**

<b>1. RIASSUNTO</b> .....	3
<b>2. INTRODUZIONE</b> .....	4
2.1 Suscettibilità geneticamente determinata	6
2.2 Polimorfismi genetici	7
2.3 Polimorfismi metabolici	13
2.4 Polimorfismi metabolici come componenti di caratteri complessi	17
2.5 Genotipo e fenotipo metabolico	22
<b>3. SCOPO DELLA TESI</b> .....	29
<b>4. STUDIO 1. Interazioni tra polimorfismi metabolici e fumo di tabacco nella     Malattia di Parkinson</b> .....	30
<b>5. Esposizione professionale a bassi livelli di benzene: i polimorfismi metabolici     come modulatori degli indicatori di esposizione e di ossidazione alla guanina</b> .....	40
<b>6. CONCLUSIONI FINALI</b> .....	54
<b>7. BIBLIOGRAFIA</b> .....	57
<b>8. TABELLE E FIGURE</b> .....	76
<b>9. ALLEGATI</b> .....	88
A. Elenco dei lavori scientifici pubblicati sull'argomento oggetto dalla tesi:	89
B. Copie dei lavori scientifici pubblicati sull'argomento oggetto dalla tesi.	93

## 1 RIASSUNTO

I polimorfismi metabolici, ossia le variabili espressioni fenotipiche degli enzimi coinvolti nella biotrasformazione degli xenobiotici, dovuti a differenze di sequenza genetica presenti nelle popolazioni con frequenze pari ad almeno l'1%, possono spiegare parte della variabilità interindividuale nella risposta all'esposizione a fattori di rischio.

Vengono riportati i risultati di due studi epidemiologici, in cui i polimorfismi metabolici sono stati valutati come modificatori del rischio nello sviluppo della malattia di Parkinson (MP) e come modificatori degli indicatori biologici di esposizione e di effetto nella stima del rischio derivante dall'esposizione professionale a basse dosi di benzene.

Il primo studio, retrospettivo caso-controllo, di dimensioni Europee, ha evidenziato che i polimorfismi delle glutatione *S*-transferasi M1-1 (*GSTM1*) e P1-1 (*GSTP1*) e dell'acetil *N*-transferasi 2 (*NAT-2*) modulano significativamente il ruolo "neuroprotettivo" svolto dal fumo di tabacco nei confronti della MP.

Il secondo studio, trasversale su un ampio gruppo di lavoratori professionalmente esposti alle basse concentrazioni di benzene misurabili in ambiente urbano, e costituito da taxisti, vigili urbani e benzinai, dimostra la modulazione delle concentrazioni urinarie dell'indicatore di esposizione acido *S*-fenilmercapturico (SPMA) da parte dei polimorfismi metabolici influenzanti le attività glutatione *S*-transferasiche M1-1, T1-1 e A1-1 (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTAI*). E' dimostrata inoltre la modulazione del danno ossidativo indotto dall'esposizione a benzene, valutato tramite misura degli indicatori urinari di danno ossidativo alla guanina, da parte del polimorfismo metabolico dell'enzima NAD(P)H:chinone ossidoreduttasi 1 (*NQO1*).

## 2 INTRODUZIONE

L'osservazione frequente in Tossicologia Industriale che individui diversi esposti in misura analoga agli stessi fattori di rischio possono o meno manifestare effetti indesiderati e che tali effetti, ove presenti, si presentano con differente gravità è in apparente conflitto con il postulato fondamentale della tossicologia individuato da Paracelso, secondo il quale "tutte le sostanze sono tossiche... è la dose che determina se una sostanza è tossica oppure no".

Nella relazione dose-risposta, ossia sulla curva logistica che rappresenta la distribuzione cumulativa di frequenza della risposta biologica in funzione di livelli crescenti di dose, è chiaramente apprezzabile l'esistenza di fattori di variabilità inter-individuale che concorrono nel determinare a livello individuale una diversa suscettibilità dei soggetti esposti ad uno o più fattori di rischio. Ciascun individuo della popolazione in esame trova una collocazione sulla curva in funzione della sua suscettibilità all'agente considerato, che corrisponde al reciproco della dose necessaria per produrre la risposta biologica. Gli individui "suscettibili" si situano sulla "coda" inferiore della curva, essendo per essi "efficaci" livelli di dose per i quali la maggior parte della popolazione esposta non presenta ancora effetti significativi. Alla condizione di suscettibilità si contrappone la particolare resistenza di alcuni individui, che manifestano la risposta biologica solo a livelli di dose estremamente elevati. Esistono peraltro situazioni, come ad esempio l'ipersensibilità immuno-mediata e la patologia tumorale, che si manifestano con carattere stocastico (la loro frequenza, ma non l'entità dell'effetto, aumenta con l'aumentare dell'esposizione) e che riguardano solo una frazione della popolazione.

Da un punto di vista fisiopatologico, la relazione dose-risposta trae origine da una sequenza di eventi biologici complessi che si frappongono tra l'esposizione al fattore di rischio e l'insorgenza di effetti biologici, più o meno precoci, che costituiscono la risposta biologica. Tali eventi possono essere studiati e caratterizzati, con finalità preventive, almeno indirettamente, mediante indicatori biologici, classicamente distinti in indicatori di: *dose interna*, *dose biologicamente efficace*, *effetto biologico precoce* e di *patologia clinica* (1).

Mentre in modelli di tipo deterministico, gli eventi biologici successivi all'esposizione al fattore causale si susseguono secondo una sequenza inevitabile, in funzione dell'entità della dose o della durata dell'esposizione, in modelli di tipo multifattoriale, quale quello della patologia lavoro-correlata, la sequenza degli eventi biologici nelle fasi successive all'esposizione al fattore di rischio è modulata (in senso facilitante o ostacolante) nella sua progressione da variabili interferenti o confondenti, esterne o proprie del soggetto, genetiche o acquisite, che tendono ad interagire tra di loro e con il fattore di rischio. Tali variabili ed il complesso delle loro interazioni rendono ragione della variabilità intra- ed inter-individuale degli indicatori biologici ed in ultima analisi della risposta all'esposizione al fattore di rischio. I fattori di variabilità della risposta biologica possono essere schematicamente distinti in *genetici* ed *acquisiti* e per alcuni di essi sono state proposte misure, ad esempio dell'attività metabolica o del genotipo, come *indicatori di suscettibilità*.

## 2.1 Suscettibilità geneticamente determinata

Con l'eccezione di alcune patologie monogeniche ereditarie dovute a mutazioni genetiche, trasmesse con modalità per lo più autosomica recessiva, in cui l'esposizione a fattori di rischio determina invariabilmente nei soggetti affetti (omozigoti) e talora anche nei portatori (eterozigoti) effetti indesiderati che non si manifestano nella popolazione sana, la patologia lavoro-correlata, come risposta biologica all'esposizione a fattori di rischio di origine ambientale/occupazionale –xenobiotici, nel caso dei composti chimici pericolosi– può essere considerata un carattere genetico complesso al cui sviluppo concorrono interazioni gene-ambiente ossia tra tratti genetici individuali polimorfici –polimorfismi genetici– e fattori di origine ambientale e professionale, nonché interazioni gene-gene, ossia tra più tratti genetici.

L'inducibilità dell'espressione genica, la complessità delle possibili combinazioni o interazioni tra le diverse vie enzimatico-metaboliche coinvolte nei meccanismi di biotrasformazione, riparazione del danno genotossico, controllo della proliferazione cellulare ed apoptosi, delle risposte infiammatoria e immunitaria, l'influenza di condizioni acquisite, come patologie d'organo concomitanti, nonché la variabilità dell'esposizione a fattori di rischio pertinenti, componente essenziale perché la suscettibilità possa manifestarsi, o a fattori interferenti collegati allo stile di vita, alla dieta, all'ambiente in generale, sono tutti elementi che concorrono alla realizzazione di caratteri complessi, la cui distribuzione nella popolazione tende ad assumere il carattere gaussiano proprio della relazione dose-risposta. L'area delle interazioni gene-ambiente e gene-gene include circa il 90% dei casi; il restante 10% è distribuito nelle due “code” della distribuzione ed è rappresentato dai soggetti geneticamente più suscettibili (“coda”

sinistra della distribuzione) e da quelli più resistenti, esposti alle dosi più elevate (“coda” destra della distribuzione).

I geni coinvolti possono agire come alleli multipli indipendenti (eterogeneità genetica della patologia multifattoriale) o in maniera reciprocamente additiva (eredità poligenica) o come fattori epistatici. In ogni caso, essi non sono né necessari né sufficienti per lo sviluppo degli effetti, ma solo predisponenti, nel senso che agiscono da modificatori d’effetto, e dunque del rischio. Quest’ultimo si manifesta solo quando le interazioni gene-ambiente e gene-gene superano un certo valore soglia. I tratti genetici implicati possono influenzare ciascuna delle tappe frapposte tra esposizione a xenobiotici e comparsa degli effetti biologici e possono dunque coinvolgere i sistemi enzimatico-metabolici da cui dipende la biotrasformazione delle sostanze chimiche, la riparazione degli acidi nucleici, il controllo della proliferazione cellulare e dell’apoptosi, della risposta immunitaria e dell’assetto neuroendocrino.

## **2.2 Polimorfismi genetici**

Il completamento del Progetto Genoma nel 2003 (2, 3) ha consentito di definire che approssimativamente meno del 2% del genoma umano, circa 20.000 geni, codifica per un prodotto proteico (4, 5). Il numero è relativamente piccolo, se paragonato a quello contenuto in altre specie animali o vegetali. La maggior parte (più del 50%) del genoma è costituito da sequenze ripetitive di vario tipo, la cui funzione, inizialmente considerata nulla (da cui il termine “DNA spazzatura”) è ancora oscura. La moderna genomica funzionale mette tuttavia, in luce una complessità crescente sia a livello di sequenze geniche, che di sistemi che regolano l’espressione proteica, che il dogma centrale della

biologia molecolare “un gene, una proteina” non può più ritenersi valido in assoluto. I geni non sono uniformemente distribuiti ma tendono a concentrarsi su alcuni cromosomi (il 17, il 19 ed il 22), rispetto ad altri (il 4, l'8, il 13, il 18, il 21 e l'Y) (6) ed infatti gli autosomi con il minore numero di geni (il 13, il 18 ed il 21) sono quelli per i quali la trisomia è compatibile con la vita. La densità genica è maggiore in aree ricche di citosina e guanina, rispetto a quelle contenenti adenina e timina (6, 7). Non tutti geni sono localizzati a livello nucleare: diverse decine, coinvolte nel metabolismo energetico, sono localizzati sul cromosoma mitocondriale (8).

La variabilità all'interno della specie umana non consente di definire l'esistenza di sequenze genomiche “normali”. In corrispondenza di specifiche localizzazioni del genoma umano in cui si rilevino variazioni di sequenza tra gli individui, si utilizza tuttavia il termine “normale” o “selvatico” per indicare la variante più comune in una data popolazione. Nella forma più semplice, le variazioni di sequenza hanno due differenti possibilità, definite “alleli”. Se la frequenza dell'allele meno rappresentato è maggiore dell'1%, la variazione prende il nome di “polimorfismo” genetico. Il termine “mutazione” viene invece generalmente riservato a variazioni nella sequenza del DNA ritenute o note per essere patologiche (ad esempio le mutazioni nel gene *CFTR* che causa la fibrosi cistica) o per variazioni insorte di recente (ad esempio una variazione di una base del DNA tumorale, che non è presente nel DNA germinale del paziente). Le mutazioni più comuni, come l'emocromatosi ereditaria (incidenza circa 1/300), la fibrosi cistica (incidenza circa 1/3000), il deficit di alfa 1 antitripsina (incidenza circa 1/1700) e la neurofibromatosi (incidenza circa 1/3000) si distribuiscono con prevalenze non superiori all'1%. Oltre che per la prevalenza, i polimorfismi genetici si differenziano dalle mutazioni per le seguenti caratteristiche:

- anzichè segregare con la malattia, seguendo le modalità della trasmissione ereditaria (autosomica recessiva o dominante, associata ai cromosomi sessuali, associata al DNA mitocondriale), tendono ad associarsi in varia misura;
- non sono necessari né sufficienti dal punto di vista patogenetico;
- hanno una bassa espressività fenotipica, ossia una ridotta penetranza;
- conferiscono un basso rischio individuale.

La sequenza genomica di un individuo, detta genotipo interagendo con fattori di origine ambientale o professionale o connessi allo stile di vita crea l'individualità, definita fenotipo. Più alleli, arrangiati linearmente lungo la molecola di DNA di un individuo e distanti tra loro meno di 5 chilobasi costituiscono un aplotipo.

Nella specie umana, il livello di identità genetica tra due individui è stato stimato essere in termini di proporzionalità pari a circa il 99,6 % (9). Tuttavia, date le dimensioni del genoma umano, pari a circa  $6 \times 10^9$  paia di basi, una variabilità dello 0,4 % si traduce in differenze di circa  $24 \times 10^6$  paia di basi.

Dal punto di vista “anatomico”, tale variabilità genomica è riconducibile alle seguenti categorie di eventi, che possono interessare porzioni esoniche, introniche o regolatorie del gene: variazioni di singole paia di basi (cosiddetti *SNPs*, dall'inglese *single nucleotide polymorphism*); inserzioni o delezioni più (riguardanti la maggior parte del gene, come per *GSTM1*, *GSTT1* o *CYP2D6*) o meno estese (3 paia di basi per il gene *GSTM3*); riarrangiamenti strutturali: traslocazioni, duplicazioni (*GSTM1*, *CYP2D6*) e amplificazioni (per *CYP2D6* descritte fino a 13 copie del gene) geniche, conversioni geniche (*CYP2A6*); variazioni del numero delle ripetizioni tandem (*VNTR*, ad esempio per i geni *DAT1*, *HO-1* e *EGFR*). La localizzazione del polimorfismo ed il numero di nucleotidi coinvolti sono i principali determinanti delle conseguenze sulla cascata di

eventi che dalla trascrizione genica conduce ad un prodotto proteico e funzionale. I polimorfismi a carico di sequenze non codificanti (introniche e/o regolatorie) sono generalmente privi di conseguenze, a meno che non riguardino siti critici come le giunzioni introne-esone (allele\*4 del gene *CYP2D6*) o siti di legame di fattori trascrizionali (*GSTM3*) o siti critici di sequenze regolatorie (*CYP2E1*, *EGFR*). Mentre nel primo caso la conseguenza funzionale del polimorfismo è l'assenza di prodotto proteico per alterazione dei processi di maturazione del trascritto primario, nelle altre due situazioni il polimorfismo interferisce con i meccanismi che regolano l'espressione genica sia nel senso di un aumento che di una riduzione della sintesi proteica.

Il Progetto HapMap, completato nel 2005 (10), oltre a fornire una mappa genomica precisa degli SNPs, ha dimostrato che queste variazioni sono le più comuni nel genoma umano (circa  $10^7$ , il 90% dei polimorfismi), verificandosi mediamente ogni 800 paia di basi (circa 5-10 per gene) e sono spesso associate tra di loro. A livello genomico, si distribuiscono per lo più (2/3) nel genoma non codificante mentre, a livello cromosomico, sono meno frequenti nei cromosomi sessuali e tendono a concentrarsi in alcune regioni specifiche. E' stato calcolato che solo l'1% di essi ha chiare conseguenze funzionali sulla proteina codificata, in quanto localizzato a livello delle regioni codificanti (esoni) o regolatorie dell'espressione genica. Rispetto alla localizzazione ed alle possibili conseguenze sul prodotto proteico, gli SNPs possono essere classificati (11) in:

- cSNPs (*coding region SNPs*, ossia localizzati all'interno delle sequenze codificanti): possono alterare la sequenza aminoacidica della proteina corrispondente;
- pSNPs (*perigenic SNPs*, ossia localizzati in regioni non codificanti, nelle adiacenze di un gene): generalmente non modificano la sequenza della proteina ma possono influenzarne l'espressione;

— iSNPs (*intergenic SNPs*, ossia localizzati nelle sequenze non codificanti disperse tra i geni): generalmente non hanno conseguenze sulla proteina corrispondente.

I cSNP possono determinare conseguenze diverse a seconda del tipo di variazione nucleotidica introdotta (inserzioni, delezioni, sostituzioni di basi):

— l'inserzione o delezione di una singola base azotata causa una sfasatura del modulo di lettura del trascritto ("*frameshift*") in fase traduzionale, con conseguente sintesi di prodotto diverso da quello originario ed inattivo dal punto di vista funzionale;

— la sostituzione di una base [transizione se coinvolge due purine (adenina, guanina) o due pirimidine (citosina, timina); transversione se una purina è sostituita da una pirimidina, e viceversa] ha tre possibili conseguenze:

- ✓ il polimorfismo non modifica la sequenza aminoacidica della proteina corrispondente a causa della ridondanza del codice genetico (polimorfismo silente);
- ✓ il polimorfismo determina una sostituzione aminoacidica (*missense*), che, a seconda della localizzazione nella sequenza e delle differenze strutturali e funzionali introdotte nella proteina (polarità, dimensioni) può o meno (polimorfismo conservativo) determinare variazioni di stabilità o di affinità nei confronti del substrato;
- ✓ il polimorfismo introduce un segnale di stop (*nonsense*), sicchè la sintesi della proteina è prematuramente interrotta, con conseguente abolizione della sua funzione.

Va inoltre considerata l'eventualità di polimorfismi multipli nello stesso gene. Il fenotipo risultante può dipendere dall'effetto dominante di uno di essi sugli altri, che

quindi risulteranno ininfluenti (ad esempio per *CYP2D6*, *NAT-2*) o da una sommatoria di effetti dei singoli polimorfismi (*EPHX1*, *GSTP1*).

Individui portatori di un determinato allele per un polimorfismo possono, con elevata probabilità, essere portatori di specifiche varianti di altri polimorfismi SNPs adiacenti all'allele considerato (entro 5 chilobasi), non necessariamente localizzati nelle regioni codificanti del gene. Tale fenomeno, detto *linkage disequilibrium*, è definito dall'occorrenza di combinazioni polimorfismi con frequenza superiore all'atteso in base alla semplice casualità, per cui tali combinazioni sono trasmesse ereditariamente in blocco.

A causa di tale fenomeno, da sospettare in epidemiologia molecolare in assenza di plausibilità biologica dell'associazione evidenziata, l'associazione di uno SNP con la patologia non implica necessariamente un'associazione con i meccanismi patogenetici della stessa (12). D'altro canto, anche se non è escluso che studi successivi possano disvelare il ruolo di un altro polimorfismo patogeneticamente coinvolto, il polimorfismo in questione funge da indicatore genetico di malattia ed in quanto tale ha una sua utilità diagnostica. A tal proposito, il Progetto *HapMap* ha posto le basi per uno strumento di ricerca potente in epidemiologia genetica, il cosiddetto studio di associazione *genomewide*, condotto allo scopo di identificare associazioni tra varianti geniche (SNPs) comuni e patologie complesse. Negli ultimi 5 anni tali studi, per lo più di tipo caso-controllo, hanno consentito l'identificazione di associazioni tra SNPs, utilizzati come marcatori di regioni cromosomiche, e condizioni complesse comuni in grandi gruppi di pazienti, rivoluzionando lo studio della genetica dei caratteri complessi (13). Un risultato inaspettato di tali studi, che apre nuovi scenari d'interpretazione del ruolo del

DNA “spazzatura”, è che la maggior parte degli SNPs associati con condizioni patologiche complesse sono localizzati al di fuori delle sequenze geniche esoniche, (14). In ogni caso, la maggior parte degli SNPs associati a condizioni complesse spiegano solo una piccola proporzione del rischio di malattia (in molti casi meno del 5-10%), sostanzialmente limitando l’uso di questi indicatori a fini diagnostico-predittivi. Un’importante ricaduta degli studi di associazione *genomewide* è piuttosto l’acquisizione di informazioni sul ruolo che specifiche proteine e vie metabolico-fisiopatologiche hanno nella genesi delle malattie, ponendo le stesse come bersagli candidati per lo sviluppo di strategie preventive o diagnostico-terapeutiche.

Le inserzioni e le delezioni sono comuni e variano in ampiezza da una a migliaia di paia di basi; analogamente gli SNPs, possono non avere alcun effetto sul fenotipo o conferire un rischio di malattia. Un numero di disordini crescente, comprendente autismo e schizofrenia, è associato con la variazione del numero di copie (15), che rientra in questa classe di variazioni.

### **2.3 Polimorfismi metabolici**

Con tale termine si indicano in forma abbreviata i polimorfismi genetici che possono influenzare l’attività di enzimi, recettori, fattori trascrizionali coinvolti nelle reazioni che costituiscono il metabolismo intermedio o biotrasformazione degli xenobiotici.

La loro identificazione è avvenuta inizialmente in campo farmacologico, nell’ambito della farmacogenetica, branca che si occupa della variabilità inter-individuale nel metabolismo dei farmaci, comportante variazioni di tossicità o efficacia a dosaggi sicuri e terapeutici per la maggior parte della popolazione. I primi esempi risalgono a circa 50

anni fa, quando fu evidenziato un raro (frequenza 1/3500) deficit metabolico nei confronti del miorilassante succinilcolina, con conseguente prolungamento della paralisi muscolare indotta dal farmaco, in soggetti omozigoti per una mutazione a carico del gene della butirrilcolinesterasi (16-18). Nello stesso periodo, furono osservati, con frequenze superiori, effetti avversi a dosi terapeutiche di isoniazide, idralazina e procainamide, riconducibili a variazioni nell'emivita biologica e nei livelli plasmatici per variazioni nell'attività dell'enzima N-acetiltransferasi di tipo 2 (NAT2) (19-22). Lo studio delle concentrazioni plasmatiche dell'isoniazide dimostrò una distribuzione bimodale nella popolazione (19) che poteva dunque essere distinta in acetilatori *fast* e *slow*. Analogamente, la variabilità metabolica connessa al polimorfismo dell'attività citocromo-P450 2D6 (CYP2D6) fu identificata essere alla base dell'insorgenza di effetti tossici a dosi terapeutiche di un gran numero di farmaci metabolizzati dall'enzima. Circa il 5-10% dei soggetti Caucasic, definiti *poor metabolizers*, presentavano un deficit nell'ossidazione della debrisoquina e della sparteina, con conseguente riduzione del rapporto metabolico tra le concentrazioni plasmatiche del farmaco e quelle urinarie dei corrispondenti metaboliti ossidati (23,24). Studi di tipo genetico hanno dimostrato che il carattere segrega come tratto autosomico recessivo ed hanno, più recentemente, condotto all'identificazione di metabolizzatori ultrarapidi (alto rapporto metabolico), per amplificazione del gene *CYP2D6* (fino a 13 copie) (25).

Grazie al rapido progresso nella caratterizzazione del genoma umano è stato possibile identificare molte delle alterazioni molecolari responsabili della variabilità genetica e della conseguente variabilità fenotipica, pervenendo addirittura all'identificazione di polimorfismi, in assenza di chiare evidenze sui corrispettivi fenotipi metabolici.

Dopo assorbimento all'interno dell'organismo, gli xenobiotici subiscono una serie di modificazioni biochimiche catalizzate da reazioni enzimatiche specifiche, il cui scopo finale è quello di rendere tali composti progressivamente più idrosolubili e dunque eliminabili dall'organismo per via urinaria o biliare. Il complesso delle reazioni enzimatiche coinvolte viene schematicamente raggruppato in due fasi principali, dette fasi I e II della biotrasformazione, generalmente ma non necessariamente sequenziali, a seconda delle proprietà idrofiliche del composto di partenza.

Le sostanze lipofile (solventi organici, idrocarburi policiclici aromatici ) subiscono una serie di modificazioni iniziali tramite reazioni di fase I o di funzionalizzazione, per lo più (70-80%) catalizzate da una superfamiglia di ossidasi a funzione mista (monoossigenasi) citocromo P450-dipendenti (CYP), a localizzazione microsomiale. Tali enzimi, che catalizzano reazioni di ossidazione, riduzione ed idrolisi in presenza di ossigeno molecolare e NAD(P)H, introducono nella molecola del substrato gruppi polari, con la formazione di specie radicaliche elettrofile, chimicamente instabili e dotate di elevata reattività verso i gruppi nucleofili delle macromolecole cellulari (DNA, lipidi, proteine) presenti nell'ambiente cellulare adiacente. Un esempio tipico è rappresentato dal benzo-a-pirene (B[a]P), non cancerogeno di per sé, se non dopo bioattivazione metabolica da parte delle attività CYP1A1 e CYP1B1 a B[a]P-7,8 diidroepossido, successivamente idrolizzato dalla epossido idrolasi microsomiale (EPHX1) a (F)-B[a]P-trans-7,8 dididrodiole, prima della conversione da parte di CYP1B1 nell'intermedio altamente reattivo B[a]P-7,8-diidrodiolo-9,10 epossido, che forma addotti stabili al DNA ed è pertanto mutageno e cancerogeno (26, 27). In aggiunta, le reazioni monoossigenasiche tendono ad alimentare la produzione di specie reattive dell'ossigeno ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $OH^{\cdot}$ ), che possono, a loro volta, danneggiare gli stessi bersagli macromolecolari. E' stato stimato che circa il 75% dei composti cancerogeni

necessita di una bio-attivazione metabolica da parte degli enzimi di fase I per esercitare i suoi effetti genotossici e cancerogeni (28). I CYP coinvolti appartengono in particolare alle famiglie CYP1 e CYP2 ma anche alle CYP3 e CYP4 (29).

Le reazioni di fase II, o di coniugazione, sono reazioni bio-sintetiche in cui gli intermedi radicalici prodotti dalle reazioni precedenti vengono coniugati da attività enzimatiche di tipo transferasico con molecole polari endogene organiche (gruppi metile, acido glucuronico, glutatione, glicina, taurina e glucosamina) o inorganiche (solfati), allo scopo di rendere il prodotto assai più polare ed eliminabile dall'organismo per via urinaria o biliare. Dal punto di vista tossicologico, tali reazioni hanno generalmente, ma non immancabilmente, un ruolo detossificante, in quanto il legame covalente dei ligandi endogeni con le specie radicaliche ha il significato di una neutralizzazione con successiva rimozione. Un'eccezione particolarmente importante dal punto di vista tossicologico è rappresentata dalla coniugazione con glutatione catalizzata dall'isoforma glutatione S-transferasi theta-1 (GSTT1) la quale svolge effettivamente un ruolo di detossificazione metabolica nei confronti di butadiene ed etilene ossido (30) ma costituisce invece un meccanismo di bio-attivazione metabolica per composti alifatici alogenati appartenenti ai gruppi degli aloalcani ed aloalcheni, dotati di buona idrofilia e pertanto substrati diretti dell'enzima di fase II (31, 32).

Sulla base delle premesse tossicologiche di cui sopra, si comprende come i polimorfismi metabolici siano coinvolti nella definizione delle differenze inter-individuali nelle capacità di metabolizzare e dunque di bio-attivare o detossificare gli xenobiotici. In particolare, i polimorfismi metabolici possono modificare le relazioni tra esposizione ed indicatori di dose interna o dose efficace ed è quindi possibile una loro utilizzazione per affinare e personalizzare l'interpretazione dei dati raccolti nel corso del monitoraggio

biologico dell'esposizione a composti organici. I polimorfismi metabolici sono anche modificatori del rischio rispetto alle manifestazioni cliniche e sono pertanto potenzialmente utilizzabili come indicatori di suscettibilità. La maggior parte degli studi ha valutato in particolare questo secondo aspetto, indagando retrospettivamente (studi caso-controllo) l'associazione di uno o più polimorfismi con patologie multifattoriali, in particolare di tipo tumorale.

#### **2.4 Polimorfismi metabolici come componenti di caratteri complessi**

La metodologia d'indagine basata sulla ricerca di associazioni tra uno o più polimorfismi con una condizione patologica è un approccio semplicistico, contrastante con la nozione di suscettibilità come parte di una condizione complessa, risultante da interazioni molteplici tra fattori genetici a bassa penetranza ed ambientali/occupazionali o legati allo stile di vita o acquisiti. L'eccessiva semplificazione produce risultati spesso tra loro discordanti per eccesso o diluizione o mascheramento nella stima del rischio. L'approccio corretto è dunque quello di studiare, anziché i singoli fattori isolatamente, le loro interazioni, in primo luogo quelle tra esposizione al/i fattore/i di rischio e polimorfismo/i metabolico/i pertinente/i. La necessità della caratterizzazione dell'esposizione al fattore di rischio trova riscontro nella specificità dell'interazione enzima-substrato e delle vie metaboliche successive a quella indagata. Paradigmatici in tal senso risultano gli esempi di alcuni enzimi polimorfici come l'eossido idrolasi microsomiale, la glutatione S-transferasi 9-1 e l'attività N-acetil transferasica di tipo 1 e 2.

L'epossido idrolasi microsomiale (EPHX1) è un enzima di fase I che catalizza l'idratazione degli epossidi, intermedi reattivi derivanti dal metabolismo monoossigenasico citocromo P450-dipendente di numerosi composti organici, a dioli, composti dotati di maggiore stabilità, sicché la reazione ha in generale un effetto di detossificazione. Tuttavia, come dianzi ricordato, nel caso degli idrocarburi policiclici aromatici, i dioli sono sequenzialmente ossidati a diolo-epossidi, composti altamente reattivi, dotati di effetti mutageni e cancerogeni (33), sicché la reazione catalizzata dalla EPHX1 assume un significato di bio-attivazione tossicologica.

Successivamente all'escrezione biliare o alla filtrazione glomerulare dei composti coniugati con glutatione, questi subiscono, a livello degli organi emuntori, un'ulteriore conversione metabolica, avente il ruolo di recuperare per l'organismo due (glicina ed acido glutammico) dei tre aminoacidi (cisteina, glicina ed acido glutammico) costituenti il glutatione, attraverso la via dei mercapturati. Sul versante luminale della membrana plasmatica delle cellule epiteliali di rivestimento, rispettivamente gli enterociti dei microvilli dell'intestino tenue e le cellule tubulari del tubulo contorto prossimale renale, si concentrano enzimi proteolitici, come la  $\gamma$ -glutamyltranspeptidasi e la cisteinil-glicinasi, la cui attività sequenziale sui composti coniugati con glutatione conduce alla parziale degradazione di quest'ultimo, tripeptide altrimenti assai stabile, con formazione di cisteino S-coniugati. All'interno delle cellule, questi vengono generalmente N-acetilati con formazione di mercapturati. Nel caso degli aloalcani ed aloalcheni, coniugati con glutatione ad opera dell'enzima GSTT 1-1 è operativa a livello dell'epitelio tubulare renale un'ulteriore via metabolica ad opera di una  $\beta$ -liasi tissutale che bioattiva il cisteino-coniugato a radicale elettrofilo tiochetene (31), a cui è attribuita la tossicità e la cancerogenicità renale degli aloalcheni (32).

Il fenotipo “acetilatore lento” dovuto a polimorfismo del gene N-acetiltransferasi 2 (NAT-2) è risultato associato al cancro della vescica in soggetti esposti ad amine aromatiche come 2-naftilamina e 4-aminobifenile, detossificate da NAT-2, ma non in lavoratori esposti a benzidina, che si ritiene possa essere bio-attivata dallo stesso enzima (34-36). Il fenotipo “acetilatore rapido” per un polimorfismo del gene NAT-1 (NAT1\*10), è stato ripetutamente associato al carcinoma del colon (37, 38). Il meccanismo biologico sotteso a tale associazione è la bio-attivazione locale in senso cancerogenetico, NAT-1 dipendente, di amine eterocicliche assunte con la dieta.

Ogni applicazione pratica dei polimorfismi metabolici non può prescindere pertanto da una conoscenza accurata dell'enzimologia dell'attività metabolica studiata, ossia delle interazioni enzima-substrato. È noto inoltre che, per effetto di variabili cinetiche che dipendono dalla concentrazione del substrato, come la costante d'affinità, e per la ridondanza dei sistemi enzimatici deputati alla biotrasformazione, basti pensare alle 18 famiglie di CYP espresse nell'uomo, ulteriormente suddivisibili in 43 sottofamiglie per un totale di 57 differenti attività enzimatiche o alle 8 famiglie di glutatione S-transferasi, per un totale di 20 differenti enzimi, a differenti livelli di dose interna possono attivarsi vie metaboliche alternative, potenzialmente in grado di vicariare efficientemente attività enzimatiche deficitarie per ragioni geneticamente determinate.

La valutazione dei polimorfismi metabolici come potenziali indicatori di suscettibilità non può quindi prescindere dalla caratterizzazione dell'esposizione a substrati pertinenti, non solo in termini qualitativi, come di solito viene fatto, pur con qualche difficoltà, negli studi retrospettivi, ma anche quantitativi, aspetto più facilmente ricavabile negli studi trasversali o, meglio ancora, prospettici. Gli studi condotti sull'associazione tra polimorfismi e patologie sono tuttavia abbastanza carenti sotto

questo aspetto. I pochi studi in cui sia stata operata una stratificazione della popolazione valutata in base ai livelli di esposizione sembrano dimostrare piuttosto concordemente che il polimorfismo agisce da modificatore del rischio ai livelli di esposizione più bassi, superati i quali il rischio dipende quasi esclusivamente dall'esposizione. Uno studio giapponese ha dimostrato che il rischio di sviluppare tumore del polmone in fumatori si associa con il genotipo *CYP1A1 m2m2* (OR 7.3; 95% C.I. 2.1-25) solo ai livelli più bassi di consumo di sigarette, mentre a livelli più elevati il rischio è indipendente dal genotipo (39). Tale osservazione è stata successivamente riconfermata da un ulteriore studio, che ha indagato in maniera combinata i genotipi *GSTM1* e *CYP1A1* (40).

La pertinenza del polimorfismo metabolico indagato, oltre che rispetto all'esposizione al fattore di rischio, va considerata anche rispetto agli effetti studiati. Devono cioè essere noti degli effetti biochimici, derivanti dall'interazione tra esposizione e polimorfismo valutati, sul tessuto o sull'organo critico in esame. La vulnerabilità selettiva dell'organo bersaglio può essere alternativamente ricondotta ad un effetto localizzato (per meccanismi di accumulo selettivo o di tipo farmacodinamico) di un prodotto metabolico di bioattivazione o mancata detossificazione generato a distanza (ad esempio nel fegato), oppure, più frequentemente, ad un eccesso relativo di bioattivazione locale. L'evidenza di correlazioni tra polimorfismi metabolici ed indicatori di esposizione e/o di dose efficace e/o di effetti biologici precoci, oltre a spiegare parte della variabilità inter-individuale di misure utilizzate per il monitoraggio biologico, può contribuire ad approfondire la plausibilità biologica delle associazioni ritrovate con la patologia in esame. La pertinenza biologica del polimorfismo è dunque avvalorata dall'evidenza di conseguenze funzionali più o meno dirette del polimorfismo studiato a livello dell'organo bersaglio.

Negli studi retrospettivi, lo studio di condizioni multifattoriali richiede la valutazione combinata dell'associazione della patologia non solo isolatamente con l'esposizione ai fattori di rischio ed ai tratti genetici di suscettibilità ma soprattutto delle interazioni tra gli uni e gli altri nello sviluppo della patologia. In uno studio pilota sull'interazione tra fattori genetici ed ambientali nel M. di Parkinson (41) abbiamo dimostrato che mentre i polimorfismi metabolici e le esposizioni possono non essere associati o essere solo debolmente associati alla malattia, la loro combinazione può presentare frequenze molto diverse nei casi e nei controlli. Interazioni significative e biologicamente plausibili sono state evidenziate tra genotipo *CYP2D6* "poor metaboliser" (*CYP2D6 PM*) ed esposizione a solventi organici, così come tra fumo di sigaretta e genotipo *GSTM1 positive*.

Il limite principale di questa impostazione, oltre che nella complessità della procedura di stratificazione per i diversi genotipi e/o fenotipi, risiede nella necessità di casistiche sufficientemente numerose (dell'ordine di migliaia di individui) al fine di garantire un'adeguata stabilità statistica ai risultati. Ciò è influenzato in particolare dalla frequenza del polimorfismo nel gruppo in esame. L'interazione da noi osservata tra genotipo *CYP2D6* e solventi, su un campione complessivo di 100 casi e 200 controlli, pur significativa, era statisticamente instabile (OR: 14,47, intervallo di confidenza al 95%: 1,16-185,23) per l'esiguo numero dei soggetti *CYP2D6 PM* connesso con la bassa frequenza di tale variante (5-10%) nella popolazione caucasica. L'interazione non è stata poi successivamente confermata dallo studio europeo *Geoparkinson* (42). Questa situazione esemplifica bene i limiti degli studi sul ruolo del genotipo metabolico nella patologia degenerativa, conseguenti alla necessità di stratificare il campione fino ad ottenere sottogruppi che nella maggior parte dei casi risultano numericamente inconsistenti, limitando lo studio nella potenza statistica (43). D'altra parte, è verosimile

che il rischio si concentri proprio in una parte esigua della popolazione, la cui identificazione richiede un gruppo di partenza sufficientemente ampio. I risultati ottenuti da diversi studi sono frequentemente contrastanti, talora in relazione ai diversi gruppi etnici studiati ed alle diverse condizioni di esposizione considerate, ma più spesso per la scarsa numerosità dei campioni esaminati, rispetto alle necessità di stratificazione per i diversi fattori interferenti, che pure devono essere considerati. Questo ha condotto frequentemente ad osservazioni statisticamente instabili, che richiedono una valutazione critica. Tra i potenziali bias che di regola limitano gli studi retrospettivi, nel caso dei polimorfismi genetici, va ricordato il “bias di Berkson”, per cui tra i soggetti ospedalizzati è più elevata la prevalenza di varianti rare di polimorfismi metabolici rispetto alla popolazione generale (44).

## **2.5 Genotipo e fenotipo metabolico**

Un aspetto fondamentale da considerare nella selezione dei polimorfismi metabolici da testare in studi epidemiologici fondati su specifiche ipotesi è la conseguenza funzionale del polimorfismo sul prodotto proteico corrispondente, ciò che contribuisce alla definizione della correlazione tra genotipo e fenotipo metabolico. Va peraltro ricordato come alcune reazioni metaboliche, ad esempio quelle di coniugazione con glutatione, catalizzate di norma dalle glutatione S-transferasi, possano avvenire anche spontaneamente, riconducendo ancora una volta la variabilità interindividuale della risposta biologica all'interno di una distribuzione di frequenza di tipo gaussiano, piuttosto che ad un evento con distribuzione binomiale o bimodale.

In termini generali, un polimorfismo ha delle conseguenze funzionali se la proteina codificata dall'allele variante ha un'attività significativamente diversa da quella codificata dall'allele "selvatico". A titolo di esempio, si citano come funzionalmente rilevanti alcuni polimorfismi degli enzimi *NAT-2*, *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6* e *NQO1*, cui corrispondono varianti enzimatiche meno attive (*NAT-2*, *CYP2D6*, *NQO1*) o inesprese (*GSTM1*, *GSTT1*), in particolare in condizioni di omozigosi, o varianti molto più attive rispetto alle isoforme codificate dall'allele "selvatico" (*CYP2D6*, *GSTM1*).

Il meccanismo molecolare può risiedere in sostituzioni di basi (*NAT-2*, *NQO1*) o in delezioni di singoli nucleotidi (allele *CYP2D6*<sup>\*3</sup>) con sfasamento del modulo di lettura (*frameshift*) o estese alla maggior parte della sequenza genica (*GSTM1* e *GSTT1*). Nel caso dei geni *CYP2D6* e *GSTM1* sono descritti dei polimorfismi di amplificazione genica [allele *CYP2D6* *L*: da 3 a 12 copie del gene "selvatico" (25); duplicazione del gene *GSTM1* (45)], cui corrisponde un fenotipo "metabolizzatore ultrarapido".

In altri casi, sono invece descritti polimorfismi il cui corrispettivo funzionale, talora evidente in studi sperimentali *in vitro*, non è del tutto chiaro per l'uomo, *in vivo*. Tali polimorfismi sono spesso localizzati in porzioni non codificanti del gene (regioni introniche e/o regolatorie), ad esempio il polimorfismo *RsaI* del gene *CYP2E1*, ma possono anche interessare le porzioni esoniche, come ad esempio i polimorfismi a livello degli esoni 3 e 4 del gene *EPHX1*. In tali casi, non si può escludere che eventuali associazioni con la condizione in esame possano in realtà riflettere l'associazione con un locus genico adiacente, per *linkage disequilibrium*, che in epidemiologia molecolare agisce da fattore di confondimento.

Nel caso di geni a ridotta inducibilità e con polimorfismo funzionalmente rilevante come *CYP2D6* e *NAT-2*, la distribuzione nella popolazione dell'attività enzimatica è di

tipo bi o tri-modale (*CYP2D6*) per l'esistenza una buona corrispondenza genotipo-fenotipo. In tali casi, la condizione di omozigosi per l'allele "selvatico" determina un'attività enzimatica normale, l'eterozigosi un'attività intermedia e l'omozigosi per l'allele variante un'attività generalmente scarsa o nulla o più elevata del normale in caso di varianti geniche amplificate (*CYP2D6*). Di solito, tuttavia, la distribuzione delle attività enzimatiche nella popolazione segue per lo più un andamento di tipo continuo o gaussiano, con spostamento della mediana in funzione dell'esistenza o meno di fattori interferenti (induzione, inibizione, competizione) sull'attività metabolica. In tali casi, può esservi ancora una buona corrispondenza genotipo-fenotipo, ma solo in condizioni di omozigosi per l'allele variante e se a questo corrisponde una chiara conseguenza funzionale sul prodotto proteico corrispondente. Il corrispettivo fenotipico per l'omozigote selvatico e l'eterozigote è invece variabile, in funzione ad esempio dell'operatività, o meno, di fattori interferenti.

D'altra parte la crescente complessità della regolazione dell'espressione genica complica notevolmente la corrispondenza tra genotipo e fenotipo metabolico. Alcuni geni sono "nidificati" all'interno di altri geni; geni diversi possono essere localizzati su filamenti opposti (*forward* e *reverse*) della stessa sequenza nucleotidica; singoli geni possono codificare per RNA multipli o per più proteine. Le sequenze regolatorie dell'espressione genica, di cui è nota una grande varietà, possono essere localizzate in prossimità o all'interno dei geni regolati o anche a grande distanza da essi (46). A livello trascrizionale (sintesi dell'RNA messaggero, mRNA), l'espressione genica è regolata da interazioni DNA-proteina o DNA-RNA e da modificazioni chimiche del DNA che ne alterano non la sequenza primaria ma la struttura tridimensionale (47). Esiste inoltre una regolazione di tipo epigenetico, su cui le conoscenze sono cresciute notevolmente nell'ultima decade. Per modificazione epigenetica si intende

un'alterazione chimica della molecola del DNA (o delle proteine istoniche) che non ne altera la sequenza primaria (48, 49). L'esempio principale è rappresentato dalla metilazione enzimatica dei residui di guanina in regioni di DNA che non vengono attivamente trascritte nelle cellule differenziate. Il processo ha l'effetto di mantenere repressa la trascrizione dei geni adiacenti. I tumori presentano frequentemente alterazioni del profilo di metilazione al DNA (50), questo varia con il tempo e sotto l'influenza di fattori genetici ed ambientali (51).

A livello post-trascrizionale, la regolazione dell'espressione genica si esplica a livello della maturazione dell'*mRNA* (per meccanismi di *splicing* alternativo) o della sua traduzione a livello ribosomiale. A partire dal 2002, è sempre più evidente il ruolo dei micro-RNA (miRNA) nel controllo dell'espressione genica, in particolare nella patologia tumorale ed in quella da disregolazione del sistema immunitario (52-55). I miRNA sono brevi molecole di RNA endogeno, di lunghezza circa 22 nucleotidi, non codificanti per proteine ma regolanti la traduzione delle molecole di mRNA con cui interagiscono. In maniera simile agiscono gli RNA interferenti (siRNA), sintetizzati *in vitro* per inibire alcuni mRNA specifici, ed attualmente utilizzati in trials di sperimentazione clinica (56).

Per la valutazione delle attività metaboliche ci si può affidare alla valutazione diretta tramite misura del fenotipo metabolico o indirettamente tramite la caratterizzazione del genotipo metabolico ma entrambe le modalità presentano degli inconvenienti in termini di validità e riproducibilità delle misure.

La valutazione del fenotipo metabolico consiste nella somministrazione in condizioni controllate di una sostanza chimica sonda (generalmente un farmaco ma in alcuni casi anche la caffeina contenuta in una tazza di caffè) o nella determinazione di una sostanza

endogena (ad esempio il cortisolo per l'attività CYP3A4) e nella successiva determinazione di uno o più metaboliti, generalmente urinari, prodotti dall'attività enzimatica. Tale metodica ha il vantaggio di fornire una misura integrata, che tiene conto delle componenti genetiche, ambientali ed acquisite, dell'effettiva capacità metabolica del soggetto nel momento in cui viene eseguita l'indagine. In quanto tale, essa è però soggetta ad un'elevata variabilità intra-individuale, proprio per effetto dei fattori ambientali o acquisiti, operanti tramite meccanismi di induzione metabolica o di interazioni tossicocinetiche – tossicodinamiche, difficili da controllare. Ulteriori limitazioni risiedono nella variabilità pre-analitica connessa alle procedure di raccolta, conservazione e trattamento dei campioni, ed analitica, dipendente dal metodo d'analisi scelto e/o nell'interpretazione dei risultati, come la scelta del limite di separazione tra soggetti "susceptibili" e soggetti "resistenti". Il complesso di tali fattori agisce soprattutto limitando la sensibilità della misura, con conseguente sovrastima di un difetto metabolico. La misura del fenotipo metabolico sembrerebbe appropriata per enzimi a maggiore inducibilità, per i quali in particolare non sia noto un polimorfismo genetico con chiare conseguenze funzionali e la cui attività metabolica si distribuisca nella popolazione in maniera continua. E tuttavia proprio questa condizione è quella che presenta teoricamente la maggiore variabilità intra-individuale e dei possibili errori di classificazione ad essa conseguenti.

La valutazione del genotipo metabolico ha il vantaggio di utilizzare metodiche di biologia molecolare basate sulla reazione polimerasica a catena (PCR) relativamente semplici ed accurate, riproducibili, anche per l'elevata stabilità del materiale biologico su cui vengono eseguite (DNA). Errori di misura che riducono la specificità del metodo possono derivare da potenziali contaminazioni del DNA dell'individuo sottoposto ad analisi con materiale genetico estraneo, da *mispriming* nelle reazioni di PCR,

dall'amplificazione di pseudogeni, ossia geni omologhi al gene di interesse ma inattivi in senso trascrizionale e dunque privi di un corrispettivo funzionale. In caso di eterogeneità del polimorfismo, ossia di esistenza di più varianti alleliche in porzioni diverse dello stesso gene, tutte con corrispettivo funzionale (*NAT-2*, *CYP2D6*), i metodi basati su PCR non consentono di distinguere con precisione la condizione di eterozigosi (un allele pluri-variante ed uno "selvatico") da quella di eterozigosi composta (due alleli varianti), che equivale in termini funzionali ad una condizione di omozigosi variante. Non si può escludere, infine, che l'attività enzimatica del gene indagato possa risentire di ulteriori polimorfismi non indagati. È dimostrato che, in condizioni "ottimali", nel caso di un enzima scarsamente inducibile come *NAT-2*, la sensibilità della metodica PCR è del 95% mentre la specificità non supera il 50%, per un valore predittivo del 66% (57). Ciò implica che se tale misura fosse impiegata a scopo di selezione pre-assuntiva di lavoratori da ammettere ad una particolare lavorazione (esponente ad esempio ad amine aromatiche) il 34% dei soggetti sarebbe potenzialmente escluso a priori in maniera ingiustificata sulla base di una classificazione erronea. Il vantaggio principale della misura del genotipo è la sua "atemporalità", cioè non è influenzato dalla storia espositiva del soggetto; potrebbe essere sufficiente per enzimi ad espressione fissa, come *NAT2*, per i quali esiste una chiara distribuzione bimodale nella popolazione.

I limiti delle metodiche utilizzate per caratterizzare i polimorfismi metabolici hanno l'effetto di correggere in difetto la misura delle associazioni epidemiologiche tra polimorfismo e condizione in esame. È dimostrato ad esempio che un *odds ratio* di 10 per l'associazione tra *CYP2D6* "metabolizzatore veloce" e tumore del polmone si riduce a 2,5 per una sensibilità del fenotipo metabolico o una specificità del genotipo metabolico del 95% (58). In definitiva, prescindendo dalle molteplici possibili

considerazioni di ordine etico in ordine alla utilizzazione pratica dei polimorfismi metabolici quali indicatori di suscettibilità in procedure di selezione dei lavoratori, per le quali si rimanda alle conclusioni del lavoro svolto dall’Azione Europea Concertata su “problematiche etiche, sociali e scientifiche correlate all’applicazione della selezione genetica e del monitoraggio genetico dei lavoratori nel contesto di un approccio europeo alla salute ed alla sicurezza sul lavoro” (59), l’uso dei polimorfismi metabolici nel corso della sorveglianza sanitaria appare una pratica al momento prematura.

### **3 SCOPO DELLA TESI**

La tesi è stata compilata con l'obiettivo di dimostrare l'utilità dello studio dei polimorfismi metabolici come modificatori del rischio nella patologia multifattoriale e come modificatori degli indicatori biologici utilizzati nel monitoraggio biologico e degli effetti biologici precoci, in soggetti professionalmente esposti a xenobiotici. A tale scopo, vengono riportati i risultati di due studi pubblicati nel periodo di svolgimento del dottorato.

La prima applicazione riguarda uno studio retrospettivo sulla Malattia di Parkinson (MP), in cui polimorfismi metabolici pertinenti sono stati caratterizzati allo scopo di studiarne la modulazione dell'effetto protettivo che il fumo di tabacco ha sullo sviluppo della malattia.

Nella seconda applicazione, polimorfismi metabolici implicati nella biotrasformazione del benzene sono stati caratterizzati in uno studio trasversale su tre gruppi di lavoratori esposti a basse concentrazioni di benzene rilevabili in atmosfera urbana (taxisti, vigili urbani, benzinai) allo scopo di valutarne il ruolo modulante sulle concentrazioni degli indicatori di dose interna e di effetto utilizzati nel monitoraggio biologico e degli effetti precoci derivanti dall'esposizione a benzene.

#### **4 STUDIO 1. Interazioni tra polimorfismi metabolici e fumo di tabacco nella Malattia di Parkinson (60).**

La maggior parte dei casi di malattia di Parkinson (MP) insorge in forma sporadica, come tratto complesso, il cui sviluppo è dovuto principalmente ad interazioni tra fattori di origine ambientale-professionale e tratti genetici di suscettibilità (61). Il fumo di tabacco esercita un effetto “protettivo” sullo sviluppo della MP, evidenziato come associazione negativa, concordemente dimostrata da numerosi studi caso-controllo svolti negli ultimi 50 anni (62). Un’ampia meta-analisi ha stimato nei soggetti fumatori un rischio di malattia -come *odds ratio* (OR)- pari a 0.57 [intervallo di confidenza al 95% (IC 95%) compreso tra 0.52 e 0.63] (63). La causalità dell’effetto “protettivo” è confermata dall’esistenza di una relazione inversa tra dose e rischio, evidenziata da diversi studi caso-controllo e di coorte (64). Studi di coorte prospettici hanno dimostrato l’effetto “protettivo” sia in fumatori correnti [rischio relativo (RR) 0.35, IC 95% 0.26-0.47], che in ex-fumatori (RR 0.66, 95% CI 0.49-0.88) (65). Un grosso studio prospettico recente ha dimostrato anche che i fumatori avevano un minore rischio di MP e che questo era associato con la durata e l’intensità del fumo (66). I risultati di un nostro precedente studio pilota suggeriscono un ruolo modulante del polimorfismo di delezione genica della *Glutazione S-transferasi M1 (GSTM1)* sull’effetto “protettivo” del fumo di tabacco (67). I fumatori con almeno un allele del gene *GSTM1*, esprimenti l’attività enzimatica *GSTM1-1* (genotipo *GSTM1 positivo*), erano fortemente protetti, al contrario dei fumatori con delezione genica omozigote (genotipo *GSTM1 nullo*). Due studi successivi non sono stati in grado di confermare questo risultato (68, 69), mentre altri studi sull’interazione gene-tabacco hanno dimostrato una modulazione del rischio da parte degli alleli varianti della glutazione S-transferasi P1 (*GSTP1*) per i polimorfismi *Ile105Val* (70) e *Ala114Val* (68) e della monoamino ossidasi B (*MAOB*), per il

polimorfismo *MAOB 644 A>G*, in questo caso limitata ai soggetti di sesso maschile (71).

In questo studio abbiamo rianalizzato statisticamente i dati raccolti nello studio Europeo *Geoparkinson* – che aveva confermato l’associazione inversa tra fumo di tabacco e MP (72) –, allo scopo di esplorare l’eventuale modulazione di tale associazione da parte di tratti genetici polimorfici pertinenti. Malgrado il disegno retrospettivo dello studio e la sua natura esplorativa, sono state testate solo ipotesi biologicamente plausibili. I polimorfismi nei geni candidati sono stati selezionati sulla base dell’espressione a livello cerebrale e della pertinenza metabolica rispetto agli xenobiotici contenuti nel fumo di tabacco [citocromi P450 1B1 (*CYP1B1*) e 2D6 (*CYP2D6*); *GSTM1*, *GSTP1*, glutatione S-transferasi M3 e T1 (*GSTM3* and *GSTT1*), epossido idrolasi microsomiale (*EPHX1*), N-acetil transferasi 2 (*NAT2*), NAD(P)H chinone ossidoreduttasi 1 (*NQO1*)] o del loro coinvolgimento nella trasmissione dopaminergica [(trasportatore della dopamina tipo 1 (*DAT1*), recettore dopaminergico D2 (*DRD2*)] e nel metabolismo della dopamina [monoamino ossidasi A e B (*MAOA*, *MAOB*)].

**Metodi.** *Disegno dello studio.* Lo studio *Geoparkinson* è uno studio multicentrico caso-controllo, finanziato dall’UE nell’ambito del VI Programma Quadro, con lo scopo di studiare il ruolo di fattori genetici, ambientali ed occupazionali nello sviluppo del MP o del parkinsonismo (72). Sono stati reclutati circa 200 casi prevalenti di MP/parkinsonismo e 400 controlli in ciascuno di cinque centri Europei con differenti caratteristiche geografiche, socio-economiche e possibilmente genetiche, malgrado la comune etnicità Caucasica: Nord Italia (Parma), Malta, Romania Orientale (Bucarest), Nord della Scozia (Edimburgo) e Svezia Sud-Orientale (Linköping). I casi erano classificati come MP o parkinsonismo secondo i criteri della *United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank (UK PDS Brain Bank)* (73), con esclusione dei

parkinsonismi secondari a demenza o vascolari o da farmaci. I casi erano bilanciati per sesso ed età con i controlli, a loro volta reclutati da: popolazione generale (Svezia), pazienti ambulatoriali ospedalieri e soggetti della popolazione generale (Scotland, Malta), centro emostasi ospedaliero (Italia) and pazienti ricoverati (Romania). Tutti i centri coinvolti hanno ottenuto l'approvazione del protocollo da parte dei Comitati Etici locali e ciascun soggetto partecipante ha firmato un consenso informato scritto. Le informazioni individuali sono state raccolte tramite un questionario strutturato somministrato da un intervistatore appositamente addestrato (72), comprendente domande sulla abitudini tabagiche dei partecipanti. L'aver mai utilizzato prodotti a base di tabacco" è stato definito come il consumo di almeno una sigaretta/die o di due sigari/fumate di pipa alla settimana o l'uso di tabacco da fiuto/da masticare, per periodi maggiori di sei mesi. Come indice quantitativo del fumo di sigaretta nell'arco della vita è stata calcolata la variabile "pacchi-anno" (numero di sigarette fumate al giorno x numero degli anni di fumo / 20).

*Biologia molecolare.* Il DNA genomico è stato isolato da campioni di sangue venoso intero o di saliva. Tramite metodiche basate su reazione di PCR, descritte dettagliatamente in un precedente articolo (74), sono stati caratterizzati i seguenti polimorfismi genetici (numero identificativo del database dbSNP): *CYP1B1 Leu432Val* (*rs59494749*); *CYP2D6 1846 G>A* (*rs3892097*); ampie delezioni omozigoti di *GSTM1* e *GSTT1*; *GSTM3 del/AGG* nell'introne 6 (*rs1799735*); *GSTP1 Ile105Val* (*rs1695*) and *Ala114Val* (*rs1138272*); *NQO1 Pro187Ser* (*rs1800566*); *MAOA 941T>G* (*rs1799835*); *MAOB 644A>G* (*rs1799836*); *SOD 2 Val16Ala* (*rs4880*); *EPHX Tyr113His* (*rs59266540*) e *Hist139Arg* (*rs59975602*); *DAT1 1342A>G* (*rs6347*); *DRD2 TaqI-A* (*rs1800497*) e *TaqI-B* (*rs1079597*); *NAT2 282C>T* (*rs1041983*) e *341T>C* (*rs1801280*).

*Analisi statistica.* Lo studio Geoparkinson è dotato di sufficiente potenza statistica per lo studio delle interazioni gene-ambiente (74), per cui l'elevata frequenza del fumo di tabacco rispetto a quella dei fattori ambientali-professionali assicura adeguata potenza anche allo studio delle interazioni gene-tabacco. Le analisi statistiche sono state condotte valutando le frequenze dei polimorfismi genetici e dell'abitudine al fumo di tabacco nelle condizioni di caso o controllo (72, 74). L'eterogeneità delle distribuzioni dei polimorfismi genetici tra casi e controlli nei diversi paesi è stata esclusa tramite test di Breslow-day (75). L'equilibrio di Hardy-Weinberg è stato valutato, per le frequenze alleliche osservate, tramite test del chi quadro e tramite algoritmo scaricabile dalla rete all'indirizzo: [www.husdyr.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetik/applets/kitest.htm#](http://www.husdyr.kvl.dk/htm/kc/popgen/genetik/applets/kitest.htm#). I polimorfismi non in equilibrio di Hardy-Weinberg in alcuni centri sono stati esclusi dalle analisi (74). Le interazioni tra fumo di tabacco e polimorfismi genetici sono state valutate tramite regression logistica correggendo per età, genere e fattori risultati precedentemente associati al MP (aver mai subito traumi cranici con perdita di coscienza; familiarità di primo grado positiva) (74). Per la maggior parte delle analisi, è stata utilizzata la variante binaria "aver mai utilizzato prodotti contenenti tabacco" (sì vs mai). Sulla base dell'ipotesi generale che i soggetti con genotipo omozigote selvatico fossero quelli maggiormente protetti dal fumo di tabacco, i genotipi sono stati collassati in variabili binarie, raggruppando nella maggior parte dei casi gli eterozigoti con gli omozigoti varianti (gruppo di riferimento). Al contrario, nel caso dei polimorfismi di *GSTM3* e *MAOB*, il gruppo candidato (protetto) era formato da soggetti omozigoti varianti ed eterozigoti. Infatti, per il polimorfismo *GSTM3*, è stato descritto un elevato linkage disequilibrium tra l'allele variante ed il genotipo *GSTM1pos* (76) da noi rilevato come protettivo in precedenza (67) e nel caso del polimorfismo *MAOB*, abbiamo considerato le precedenti evidenze di interazioni *MAOB*-tabacco, dimostranti un effetto

protettivo dell'allele variante nei fumatori maschi (71). Per le analisi comprendenti i polimorfismi *DAT1* o *MAOA*, il gruppo candidato era costituito da omozigoti selvatici ed eterozigoti, in accordo con l'ipotesi che i soggetti portatori di una maggiore (*DAT1*) (77-79) o minore (*MAO-A*) attività (80) delle rispettive proteine potesse beneficiare di una maggiore protezione da parte del fumo di tabacco. Nelle analisi valutanti il ruolo dei polimorfismi *GSTP1*, i soggetti con l'aplotipo *GSTP1*<sup>\*</sup>*A*<sup>\*</sup>*A*, portatori cioè di due alleli selvatici al locus *GSTP1* (81) sono stati posti come gruppo di riferimento, tenendo conto dei risultati di studi precedenti (68, 70). Per entrambi i polimorfismi *DRD2*, il gruppo candidato è costituito dai soli eterozigoti, poichè per il polimorfismo *TaqIA* (82), in stretto linkage disequilibrium con il sito *TaqIB*, è nota una condizione di eterosi. I soggetti portatori di almeno un allele selvatico dei polimorfismi *NAT2* sono stati classificati come *acetilatori rapidi* e gli altri come *acetilatori lenti* (83). Per i polimorfismi *MAOA* e *MAOB* che sono localizzati sul cromosoma X, sono state condotte analisi separate per i due sessi. Le interazioni significative sono state successivamente rivalutate tramite regressione logistica, stratificando il campione secondo la tabella 2X4 (84). Le differenze nell'entità dell'abitudine tabagica tra gruppi sono state valutate tramite test U di Mann Whitney, data la distribuzione non normale (anche dopo trasformazione logaritmica) della variabile pacchi-anno. Per valutare la relazione esposizione-rischio, tale variabile è stata ricodificata in ordinale, comprendendo i non fumatori, i fumatori leggeri (pacchi-anno  $\leq$  alla mediana tra i fumatori, cioè 23.25) ed i forti fumatori (pacchi-anno  $>$  di 23.25) ed abbiamo testato le distribuzioni dei sottogruppi nei casi e nei controlli, tramite test del chi-quadro per trend tramite pacchetto statistico Graph Pad Prism 4. Il rischio associato con la variabile ordinale pacchi-anno sia da sola, che in interazione con i genotipi *GSTM1* e *NAT2* (*GSTP1* escluso, a causa del numero esiguo di soggetti con genotipo variante

*GSTP1*<sup>\*B</sup><sup>\*C</sup>) è stato calcolato tramite regressione logistica. In queste analisi, il gruppo di riferimento era costituito dai non fumatori, indipendentemente dal loro genotipo, assumendo che il polimorfismo genetico in quanto modulatore del rischio svolge un ruolo irrilevante in assenza dell'esposizione al fattore di rischio (o protettivo). I soggetti che assumevano tabacco per vie alternative al fumo di sigaretta (sigaro/pipa o da fiuto o da masticare) sono stati esclusi in tutte le analisi in cui è stata usata la variabile pacchi-anno. In una piccola (4 %) percentuale di soggetti, per vari motivi tecnici non è stato possibile ottenere una caratterizzazione genotipica completa. Nessuna correzione è stata applicata ai risultati derivanti da confronti multipli (85).

**Risultati.** In Tabella 1 sono sintetizzate le principali caratteristiche del campione valutato, costituito da 767 casi di MP e 1989 controlli, bilanciati per genere ed età. Un numero minore di casi, rispetto ai controlli, ha dichiarato di aver mai fatto uso di prodotti contenenti tabacco (41% vs 54%, OR 0.59, 95% IC: 0.51 to 0.69,  $p < 0.0001$ ) ed il consumo di sigarette in pacchi-anno era chiaramente più elevato tra i controlli ( $p < 0.0001$ ). Era evidente una chiara relazione esposizione-rischio, poiché il rischio di MP si riduceva in funzione del numero di pacchi-anno fumati (OR 0.62, 95% IC: 0.49 to 0.77,  $p < 0.0001$  e OR 0.33, 95% IC: 0.26 to 0.43,  $p < 0.0001$  per fumatori leggeri e forti, rispettivamente).

La Tabella 2 dimostra un'evidente modulazione del rischio da parte dei genotipi *GSTM1* (OR per *Pos* vs *Null*: 0.67, 95% IC: 0.47-0.95,  $p = 0.024$ ) e *NAT2* (OR per *acetilatore rapido* vs *lento*: 0.61, 95% IC: 0.43-0.87,  $p = 0.007$ ). Una modulazione significativa era evidente anche per l'aplotipo variante *GSTP1*<sup>\*B</sup><sup>\*C</sup> (OR aggiustato per <sup>\*B</sup><sup>\*C</sup> vs <sup>\*A</sup><sup>\*A</sup>: 0.27, 95% IC: 0.08-0.93,  $p = 0.038$ ), mentre non c'era alcuna evidenza per gli altri aplotipi varianti (<sup>\*A</sup><sup>\*B</sup>; <sup>\*A</sup><sup>\*C</sup>; <sup>\*B</sup><sup>\*B</sup>; <sup>\*C</sup><sup>\*C</sup>; OR comprese tra 0.80 e 0.92).

Le interazioni statisticamente significative sono state ulteriormente valutate tramite tabella 2X4 (Tabella 3): in tutti i casi, i fumatori risultavano significativamente protetti dal rischio di MP. Tuttavia, tra costoro l'effetto era particolarmente evidente tra i soggetti con genotipi *GSTM1 pos*, *NAT2 acetilatori rapidi*, e aplotipo *GSTP1 \*B\*C*.

L'analisi delle interazioni tra polimorfismi e livelli di pacchi-anno ha confermato la dipendenza dalla dose dell'effetto neuroprotettivo, dimostrando chiaramente anche che a ciascun livello di consumo di sigarette i soggetti con genotipo *GSTM1 pos* o *NAT-2 acetilatore rapido* dimostravano una neuroprotezione maggiore rispetto ai soggetti con genotipo opposto (Tabella 4).

**Discussione.** Se il fumo di tabacco è una miscela estremamente complessa, contenente più di 6000 composti diversi (86) anche l'abitudine tabagica è un carattere genetico complesso, in cui è stato identificato un ruolo preminente da parte di geni implicati nella trasmissione dopaminergica (87). I risultati del presente studio suggeriscono che l'effetto neuroprotettivo del fumo di tabacco rispetto alla MP può essere modulato dai polimorfismi genetici di enzimi coinvolti nella biotrasformazione degli xenobiotici. I fumatori sembrano particolarmente protetti dalla MP se esprimono le attività glutatione S-transferasiche *GSTM1-1* o *GSTP1-1 \*B\*C* o un'attività normale dell'enzima *NAT-2*. La plausibilità biologica delle interazioni evidenziate è rafforzata dalle analisi stratificate per intensità di abitudine tabagica, espressa in livelli di pacchi-anno. Le interazioni coinvolgenti i polimorfismi *GSTM1* e *GSTP1* sono state già valutate in precedenza da altri studi elencati in Tabella 5. Le discordanze tra studi epidemiologici possono essere ricondotte a diverse cause, quali l'eterogeneità nelle dimensioni o nelle caratteristiche dei campioni studiati, la scelta dei gruppi di riferimento e le metodologie di analisi statistica. Negli ultimi dieci anni è diventato sempre più chiaro che i polimorfismi genetici non dovrebbero essere considerati fattori di rischio ma piuttosto

modificatori di effetto, ciò che giustifica la scelta di un differente gruppo di riferimento nel presente studio, rispetto al nostro precedente studio pilota (67). Solo casualmente, probabilmente per le distribuzioni di frequenza dei genotipi *GSTM1*, le stime del rischio risultano simili, utilizzando come gruppi di riferimento i soggetti non fumatori sia *GSTM1pos* (67) che *GSTM1null* (presente studio). Tra gli studi delle interazioni gene-tabacco, il *Geoparkinson* è il più grande e dunque quello con maggiore potenza statistica.

L'effetto "protettivo" del fumo di tabacco rispetto alla MP può riconoscere diversi meccanismi. La nicotina può stimolare il rilascio di dopamina ed esplicitare proprietà antiossidanti (62), sebbene il fumo possa inibire a livello cerebrale entrambe le attività MAO-A e MAO-B (88) anche indipendentemente dalla nicotina (89-93). Le glutatione S-transferasi (GST) possono giocare un ruolo principale nella detossificazione di neurotossine a livello cerebrale (94) e la loro espressione può essere indotta dalle sostanze presenti nel fumo di tabacco attraverso le sequenze regolatorie ARE e XRE (95). L'isoforma GSTP1-1, espressa a livello cerebrale e della barriera emato-encefalica (96), dimostra un'elevata specificità verso i diolo-epossidi derivati dagli idrocarburi policiclici aromatici (97) contenuti nel fumo di tabacco. Secondo i nostri risultati, la neuroprotezione indotta dal fumo di tabacco sarebbe particolarmente efficace in soggetti con aplotipo *GSTP1*<sup>\*B</sup><sup>\*C</sup> e dunque esperimenti a livello tissutale la variante alloenzimatica costituita dalle subunità <sup>\*B</sup> (Val<sup>105</sup>/Ala<sup>114</sup>) e <sup>\*C</sup> (Val<sup>105</sup>/Val<sup>114</sup>), la cui efficienza catalitica è diversa da quella della subunità <sup>\*A</sup> (Ile<sup>105</sup>/Ala<sup>114</sup>) e variabile a seconda dei substrati (98). E' già stata dimostrata un'associazione dell'aplotipo *GSTP1*<sup>\*C</sup> all'abitudine tabagica nella MP (68), ma il genotipo *GSTP1 Val*<sup>105</sup>*Val*<sup>105</sup> è stato negativamente associato con la MP tra i fumatori (70). L'interazione tra *GSTP1* e pesticidi può anch'essa modificare il rischio di MP (81). A nostro parere, l'induzione di

glutazione S-transferasi in fumatori esprimenti gli isoenzimi GSTM1-1 o GSTP1-1 \*B\*C può essere associata con una particolare capacità neutralizzante verso le neurotossine dopaminergiche. Nella *substantia nigra* dei fumatori, gli effetti farmacologici indotti dal fumo di tabacco stimolano la sintesi di dopamine e la trasmissione dopaminergica. Ciò favorirebbe l'autoossidazione spontanea della dopamina, con livelli aumentati di aminocromo, un ortochinone che può scatenare stress ossidativo tramite fenomeni di *redox cycling* (99) e che è detossificato dalla GSTM1-1 (94, 101) espressa a livello astrocitario (100). Il sistema dopaminergico dei fumatori con genotipo *GSTM1 pos* può dunque beneficiare di una maggiore protezione dallo stress ossidativo.

L'interazione NAT2-tabacco non è mai stata descritta in precedenza. La NAT-2 è un enzima di fase 2 espresso in numerosi tessuti, compreso il cervello (102), con attività detossificante verso le amine aromatiche e ariliche tra cui sono comprese alcune neurotossine (103). La corrispondenza genotipo-fenotipo per quest'attività enzimatica è buona (23) e l'attività non è influenzata dall'abitudine tabagica (104). Una meta-analisi (su 1206 casi e 1619 controlli) ha confermato l'associazione significativa tra MP e genotipo/fenotipo NAT-2 acetilatore lento (105) ed è inoltre descritto un ceppo di ratto NAT-2 acetilatore lento dimostra una particolare vulnerabilità alla 6-idrossidopamina (106). Lo stato NAT-2 può anche influenzare l'espressione genica e la morte cellulare nei neuroni dopaminergici (107). La plausibilità biologica dell'interazione osservata può dunque risiedere sulla combinazione degli effetti benefici del fumo di tabacco sulla trasmissione dopaminergica con migliori capacità detossificanti e ridotta morte cellulare in fumatori portatori di genotipi *NAT2 acetilatori rapidi*.

I nostri risultati –sebbene supportati dalla plausibilità biologica e da precedenti osservazioni– sono basati su confronti statistici multipli che potrebbero favorire associazioni casuali. D'altra parte le stime del rischio e degli intervalli di confidenza

ottenuti negli studi epidemiologici (come gli studi di mortalità) non richiedono correzioni per confronti multipli. Ulteriori limitazioni dello studio comprendono l'impossibilità di nascondere agli intervistatori lo stato dei soggetti e l'uso di diagnosi basate su cartelle cliniche in alcuni centri (Scozia, Romania e Malta). Sulla base di queste considerazioni, per l'interpretazione dei risultati ottenuti è necessario esercitare cautela, per cui le ipotesi generate richiederanno ulteriori conferme da studi epidemiologici o sperimentali appositamente disegnati.

## **5 Esposizione professionale a bassi livelli di benzene: i polimorfismi metabolici come modulatori degli indicatori di esposizione e di ossidazione alla guanina (108).**

Il benzene è un composto chimico ampiamente utilizzato in ambito industriale ed un inquinante ambientale ubiquitario, classificato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) come cancerogeno certo per l'uomo (classe I, 109). E' stato stimato che il rischio aggiuntivo di sviluppare leucemia per esposizione a benzene sia di circa 6 casi per milione in individui esposti nell'arco della vita a concentrazioni ambientali medie di benzene di  $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (110). Nell'ultima decade, la riduzione del contenuto di benzene nella benzina senza piombo (dal 5% a <1%, Direttiva Europea 98/70/EC) ha portato ad un significativo abbattimento delle concentrazioni ambientali entro i parametri raccomandati di qualità dell'aria di  $5-10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , come documentato dai più recenti studi su gruppi di lavoratori che svolgono la loro attività in ambiente urbano (vigili urbani, autisti di bus e taxisti) (111-114). Tali studi hanno evidenziato che il monitoraggio biologico di lavoratori esposti a basse concentrazioni di benzene richiede l'uso di uno o, meglio, più indicatori di esposizione, come gli acidi *S*-fenilmercapturico (*S*-PMA) e *trans,trans*-muconico ed il benzene urinario (U-B) determinati con tecniche altamente sensibili e selettive (115). Dopo assorbimento, il benzene viene biotrasformato a idrochinone e catecolo, in grado di generare semichinoni e specie reattive dell'ossigeno per meccanismi di *redox cycling* (116). E' stata infatti dimostrata un'associazione positiva tra esposizione ambientale-professionale a benzene e danno ossidativo, in particolare al DNA (117-120). Sebbene i livelli tissutali e circolanti di 8-idrossi-7,8-diidro-2'-deossiguanosina (8-oxodGuo) siano stati estesamente indagati come indicatori biologici di stress ossidativo, l'invasività delle procedure di campionamento ed il rischio di ossidazione artificiale durante la

conservazione dei campioni e l'estrazione del DNA (121-122) ne hanno limitato l'impiego in studi epidemiologici sull'uomo su larga scala. Per questa ragione, il danno ossidativo al DNA in soggetti esposti a benzene è stato valutato con metodi basati sul *Comet assay* (123-124). Recentemente, l'avvento della cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem (LCMS- MS) ha reso possibile la determinazione nell'urina dei derivati ossidati della guanina, come la 8-oxodGuo stessa, l'8-idrossi-7,8-diidroguanosina (8-oxoGuo), e l'8-idrossi-7,8-diidroguanina (8-oxoGua), in questo caso con ridotta manipolazione del campione e minor rischio di artefatti preanalitici, rispetto alle determinazioni su sangue ed ai tessuti (125-126). Questi indicatori originano per effetto di differenti sistemi di riparazione del danno ossidativo alla guanina contenuta negli acidi nucleici o nei 2'(deossi)ribonucleotidi. La 8-oxodGuo riflette sia la riparazione del nucleotide trifosfato 2'-deossiguanosina ossidato a livello del pool cellulare dei 2'-deossiribonucleotidi ad opera dell'enzima MTH1 (127), che la riparazione della 8-oxodGuo nel DNA ad opera di un sistema endonucleasico/nucleotidasico (128) o del sistema di escisione nucleotidica (NER) (129). La 8-oxoGuo può originare dall'ossidazione della guanina presente nell'RNA, come risultato di turnover molecolare o riparazione, anche se un tale sistema specifico per l'RNA non è stato ancora descritto (130). La 8-oxoGua origina, almeno in parte, da specifiche attività glicosilasiche del sistema di riparazione per escissione di basi (BER) su residui di guanina ossidata nel DNA (131) o ancora potenzialmente dal turnover o riparazione dell'RNA (132). La determinazione non invasiva di tali indicatori nello stesso campione urinario utilizzato per determinare gli indicatori di esposizione a benzene potrebbe essere utile per valutare lo stress ossidativo e l'efficacia dei sistemi di riparazione del danno ossidativo al DNA (e all'RNA) in soggetti professionalmente esposti al solvente organico. A causa delle proprietà antiossidanti dell'urina, questi

indicatori sono stabili per anni, se i campioni sono adeguatamente conservati (133). E' stato recentemente dimostrato che soggetti esposti a concentrazioni di benzene inferiori a 0.1 ppm metabolizzano il benzene più efficientemente che soggetti esposti a livelli superiori, suggerendo che i rischi per la salute associati a concentrazioni basse o molto basse possano essere considerevolmente maggiori di quanto predetto per estrapolazione lineare da studi epidemiologici su lavoratori esposti a concentrazioni dell'ordine di decine o centinaia di ppm (134). Abbiamo recentemente valutato l'esposizione a benzene in taxisti e vigili urbani della città di Parma con metodiche basate su LC-MS/MS (113, 135). Nel gruppo dei taxisti abbiamo dimostrato un ruolo modulante sull'escrezione urionaria di S-PMA da parte dei polimorfismi genetici delle glutatione S-transferasi M1-1 (*GSTM1*) e A1-1 (*GSTA1*), mentre altri hanno riportato un ruolo anche per la T1-1 (*GSTT1*) (136, 137). Negli esposti a benzene, l'enzima NADPH:chinone ossidoreduttasi 1 (NQO1) svolge un ruolo protettivo per la sua capacità di detossificazione dei chinoni tramite una riduzione a doppio elettrone (138, 139).

Il presente studio è stato condotto allo scopo di: (i) valutare le relazioni tra indicatori di esposizione e di stress ossidativo in lavoratori esposti a basse concentrazioni di benzene, considerando anche il possibile ruolo modulante da parte del polimorfismo *NQO1*; (ii) valutare il ruolo modulante dei polimorfismi *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTA1* sull'escrezione di S-PMA.

**Materiali e Metodi.** *Soggetti.* Il gruppo studiato comprendeva 37 autisti di taxi, 100 vigili urbani e 102 benzinai. A tutti è stato chiesto di non modificare le proprie abitudini lavorative e di compilare un questionario per la raccolta di informazioni su attività lavorativa e abitudini tabagiche, sintetizzate in Tabella 6. Il protocollo di studio, è stato

approvato dal Comitato Etico dell'Università di Parma e tutti i soggetti partecipanti hanno firmato un consenso informato scritto.

*Monitoraggio biologico.* Da ciascun lavoratore è stato raccolto un campione urinario di fine turno lavorativo, frazionato in diverse aliquote, congelate a -20 °C fino ad analisi. Le determinazioni degli indicatori di esposizione e di danno ossidativo alla guanina sono state eseguite tramite LC-MS-MS con il metodo della diluizione isotopica, su uno spettrometro di massa triploquadrupolo PE-Sciex API 365 (Applied Biosystems, Thornhill, Canada), equipaggiato con un interfaccia TurboIonSpray (TISP) per elettrospray assistito pneumaticamente. Gli indicatori di esposizione, *t,t*-MA ed *S*-PMA, sono stati determinati con protocollo già descritto in precedenza (113, 135). Il limite di detezione (LOD), calcolato come rapporto S/N>3, era di 0.1 µg/L per l'*S*-PMA e 2.5 µg/L per il *t,t*-MA. Il coefficiente di variazione (CV%) del metodo era compreso tra 1.3 e 2.6 % per tutte le determinazioni intra- e inter-giornaliere. Gli indicatori di ossidazione alla guanina, 8-oxodGuo, 8-oxoGuo and 8-oxoGua sono stati determinati con metodica già descritta (125), modificata per consentire la determinazione della cotinina nella stessa corsa cromatografica. Brevemente, ai campioni filtrati (0.2 mL) era aggiunto un egual volume di una miscela acquosa di SI contenente 2.5 µg/L di [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]8-oxodGuo, 7.5 µg/L di [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]Guo, 75 µg/L di [<sup>13</sup>C<sub>1</sub>,<sup>15</sup>N<sub>2</sub>]8-oxoGua e 200 µg/L di cotinina-*d*<sub>3</sub>. I campioni erano incubati a 37°C per 10', miscelati su vortex, centrifugati (10' a 10000 g) e iniettati (30 µL). La separazione degli analiti è stata eseguita su Colonna Atlantis®dC<sub>18</sub> (100 x 2.0 mm d.i., 3µm; Waters, Milford, MA, USA) con proporzioni variabili di acido formico acquoso 10 mM (pH 3.75) e metanolo ad un flusso di 0.2 mL/min. Gli analiti (e gli SI) sono stati ionizzati positivamente e sono state monitorate le seguenti transizioni SRM: *m/z* 284→168 e *m/z* 289→173 per 8-oxodGuo e relativo SI [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>]8-oxodGuo; *m/z* 300→168 e *m/z* 289→157 per 8-oxoGuo e relativo

SI [ $^{15}\text{N}_5$ ]Guo;  $m/z$  168→140 e  $m/z$  171→142 per 8-oxoGua e relativo SI [ $^{13}\text{C}_1,^{15}\text{N}_2$ ]8-oxoGua;  $m/z$  177→80 e  $m/z$  180→101, per cotinina e SI cotinina- $d_3$ . Per l'analisi quantitativa, le calibrazioni sono state ottenute iniettando pool di urina e soluzioni standard negli intervalli di concentrazione 0.25-25  $\mu\text{g/L}$  per 8-oxodGuo, 0.75-75  $\mu\text{g/L}$  per 8-oxoGuo, 7.5-750  $\mu\text{g/L}$  per 8-oxoGua, e 5.0-5000  $\mu\text{g/L}$  per la cotinina. Per ciascun analita, sono state costruite le curve di calibrazione tramite analisi di regressione lineare del rapporto tra le aree dell'analita e dello SI vs la concentrazione nota dell'analita iniettato ( $r_2 > 0.998$ ). I limiti di quantificazione (LOQ) erano rispettivamente 0.2, 0.3, 0.5 ed 1.0  $\mu\text{g/L}$  per 8-oxodGuo, 8-oxoGuo, cotinina e 8-oxoGua. Il CV% variava tra 2.0% e 6.8% per tutti gli analiti e per tutte le determinazioni a livello intra- ed intergiornaliero. In ogni caso, le concentrazioni dei metaboliti urinari sono state espresse in funzione della creatinina ( $\mu\text{g/g creat.}$ ), misurata tramite reazione di Jaffe (140). I campioni con concentrazioni di creatinina minori di 0.3 g/L o maggiori di 3.0 g/L sono stati esclusi dall'analisi statistica, seguendo le raccomandazioni della Conferenza Americana degli Igienisti industriali Governativi (141).

*Analisi dei genotipi.* I metodi per le analisi genetiche sono stati precedentemente descritti in dettaglio (113). Il DNA genomico è stato isolato da 1 mL di sangue periferico intero tramite kit commerciale PureGene (GENTRA SYSTEMS, Minneapolis, MN). Il protocollo di studio sui vigili non comprendeva il prelievo di sangue, per cui per tale gruppo non sono stati disponibili campioni su cui effettuare le analisi genetiche. I genotipi *NQO1*, *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTAI* sono stati caratterizzati con metodi già pubblicati, minimamente modificati (142-144). Le frequenze genotipiche osservate non differivano significativamente dall'atteso (145) e le frequenze alleliche *GSTAI* e *NQO1* erano in equilibrio di Hardy-Weinberg. Sono state osservate le seguenti frequenze genotipiche: *NQO1*<sup>\*</sup>*I*<sup>\*</sup>*1* 57% (n=76), *NQO1*<sup>\*</sup>*I*<sup>\*</sup>*2* 36% (n=48),

*NQO1*\*2\*2 7% (n=10); *GSTAI*\*A\*A 33% (n=44), *GSTAI*\*A\*B 55% (n=72), *GSTAI*\*B\*B 12% (n = 16); *GSTM1* positive 50% (n=71); *GSTT1* positive 79% (n=112).

*Analisi statistica.* Le analisi statistiche sono state eseguite tramite programma SPSS (versione 16.0) per Windows™ (Chicago, IL). Tutte le determinazioni analitiche sono risultate al di sopra dei rispettivi LOD. La normalità o log-normalità delle distribuzioni è stata valutata tramite il test di Kolmogorov-Smirnov per un campione. Test statistici parametrici sono stati applicati alle variabili tal quali o dopo trasformazione logaritmica, a seconda delle loro distribuzioni. Gli indicatori biologici di stress ossidativo e di esposizione a benzene si distribuivano in maniera log-normale, mentre la cotinina si distribuiva normalmente nei non-fumatori e log-normalmente nei fumatori. Le differenze tra due gruppi sono state valutate tramite test *t* di Student per campioni indipendenti, mentre l'analisi della varianza ad una via (ANOVA), seguita dal test *post hoc* di Bonferroni per confronti multipli è stata utilizzata nel caso di confronti tra più gruppi. Le correlazioni tra variabili sono state valutate tramite coefficiente di correlazione *r* di Pearson, mentre la regressione lineare multipla per passi, con livelli di significatività di 0.05 e 0.10 per l'inserimento e la rimozione delle variabili dal modello è stata utilizzata per valutare il contributo di età, genere, abitudine tabagica, genotipo *NQO1*, concentrazione della creatinina urinaria ed esposizione a benzene (come concentrazione di *S*-PMA o *t,t*-MA) alla variabilità degli indicatori di stress ossidativo (µg/L). L'analisi della covarianza (ANCOVA) è stata utilizzata per valutare il contributo dei polimorfismi genetici e altre covariate (cotinina urinaria e creatinina) alla variabilità dell'*S*-PMA. Nelle analisi statistiche, sia i genotipi *NQO1*, che quelli *GSTAI* sono stati collasati in variabili binarie, distinguendo nel primo caso i soggetti omozigoti selvatici da quelli con almeno un allele variante, e nel secondo caso i soggetti omozigoti varianti

(genotipo  $GSTAI^*B^*B$ ) da quelli con almeno un allele selvatico ( $GSTAI^*A$ ). Il livello di significatività per tutti i test è stato fissato a  $p \leq 0.05$  (a due code).

**Risultati.** La Tabella 7 riporta medie e deviazioni standard geometriche degli indicatori biologici nei gruppi di lavoratori, classificati per abitudine tabagica. I fumatori eliminavano concentrazioni significativamente più elevate di metaboliti del benzene rispetto ai non fumatori ( $p < 0.005$ ), con l'eccezione del  $t,t$ -MA negli autisti di taxi. Gli indicatori di stress ossidativo alla guanina presentavano un andamento simile, ma con differenze nei diversi gruppi: 8-oxoGua era significativamente più elevata ( $p < 0.0001$ ) nei vigili, 8-oxodGuo nei benzinai ( $p < 0.05$ ), 8-oxoGuo e 8-oxoGua negli autisti di taxi ( $p < 0.05$ ). L'ANOVA ha evidenziato differenze significative nelle concentrazioni di tutti gli indicatori tra i gruppi di lavoratori, sia nei fumatori che nei non fumatori, ad eccezione dell'8-oxoGua. In particolare, i taxisti presentavano livelli significativamente maggiori di  $S$ -PMA e 8-oxoGuo rispetto agli altri gruppi, sia tra i fumatori che tra i non fumatori ( $p < 0.0001$  per tutti i confronti, eccetto  $p < 0.003$  per 8-oxoGuo nei fumatori), e livelli più elevati di  $t,t$ -MA tra i non fumatori ( $p < 0.0001$ ). I vigili urbani eliminavano minori concentrazioni di 8-oxodGuo, rispetto agli altri gruppi, sia tra i fumatori ( $p=0.001$ ), che tra i non fumatori ( $p < 0.05$ ). Correlazioni significative si osservavano nell'intero gruppo sia tra indicatori di stress ossidativo ( $0.32 < r < 0.71$ ,  $p < 0.0001$ ), che tra indicatori di esposizione e stress ossidativo ( $0.28 < r < 0.52$ ,  $p < 0.0001$ ). La Tabella 8 mostra la matrice di correlazione di Pearson tra gli indicatori biologici nei soggetti classificati per abitudine tabagica. Tra i non fumatori le correlazioni significative erano evidenti tra  $SPMA$  e  $t,t$ -MA ed indicatori di stress ossidativo ( $p < 0.01$ ) e tra creatinina e tutti gli indicatori, tranne la cotinina, che non correlava con nessun altro parametro. Tra i fumatori, la cotinina correlava con gli indicatori di esposizione ma non con gli indicatori di ossidazione alla guanina o con la creatinina. In questo gruppo, l'8-oxoGua

non correlava con gli altri indicatori, ad eccezione di 8-oxoGuo e creatinina. I livelli degli indicatori di stress ossidativo non differivano nei soggetti classificati per genotipo *NQO1*, sebbene nei soggetti con genotipo omozigote selvatico *NQO1\*1\*1* si siano misurate le più basse concentrazioni di 8-oxodGuo e 8-oxoGuo, rispetto ai soggetti con almeno un allele variante. I modelli di regressione lineare multipla sull'intero campione erano altamente significativi per 8-oxodGuo and 8-oxoGuo ( $r^2$  aggiustati compresi tra 0.524 e 0.583) utilizzando *S-PMA* o *t,t-MA* come indicatori di esposizione, come indicato in Tabella 9. Sebbene statisticamente significativo, l' $r^2$  aggiustato del modello per 8-oxoGua era inferiore, ossia 0.164. La concentrazione di creatinina è risultato il predittore più importante, spiegando il 49%, il 43% ed il 9% della varianza di 8-oxodGuo, 8-oxoGuo ed 8-oxoGua, rispettivamente ( $p < 0.0001$ ). I livelli di 8-oxoGuo sono risultati significativamente influenzati da *t,t-MA* e *S-PMA* ( $p < 0.0001$ ), l'esposizione spiegando circa il 6% ed il 10% della varianza, rispettivamente ed anche dal dal polimorfismo *NQO1* ( $p < 0.05$ ), i soggetti con genotipo omozigote selvatico presentando livelli minori di indicatore, rispetto ai soggetti con almeno un allele variante. I livelli di 8-oxodGuo erano significativamente influenzati dal solo *S-PMA* ( $r^2p = 0.034$ ,  $p = 0.003$ ), mentre quelli di 8-oxoGua non erano modificati dai metaboliti del benzene. In nessun caso, il genere influenzava significativamente le concentrazioni degli indicatori di ossidazione alla guanina, mentre l'abitudine tabagica influenzava significativamente i livelli di 8-oxodGuo ed 8-oxoGua ( $p < 0.05$ ), e l'età solo quelli di 8-oxoGuo ( $p < 0.0001$ ). L'analisi di regressione multipla sul campione stratificato per abitudine tabagica confermava l'analisi condotta sul campione complessivo nei modelli contenenti *S-PMA* come predittore. L'*S-PMA* era significativamente associato con 8-oxodGuo e 8-oxoGuo sia nei non fumatori ( $r^2p = 0.013$ ,  $p = 0.029$ ;  $r^2p = 0.054$ ,  $p < 0.0001$ ) che nei fumatori ( $r^2p = 0.045$ ,  $p = 0.036$ ;  $r^2p = 0.096$ ,  $p = 0.003$ ). Il ruolo

modulante del polimorfismo *NQO1* era evidente solo nei non fumatori ( $r^2_p = 0.021$ ,  $p = 0.035$ ). Al contrario, utilizzando il *t,t*-MA come predittore, l'esposizione a benzene era significativamente associata con l'escrezione di 8-oxoGuo e solo nei non fumatori ( $r^2_p = 0.042$ ,  $p < 0.0001$ ).

In un sottogruppo di 130 soggetti, comprendente taxisti e benzinai, l'ANCOVA a tre vie evidenziava una significativa modulazione dell'escrezione di *S*-PMA da parte dei polimorfismi delle glutatione S-transferasi *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTAI* ( $F=6.314$ ,  $p<0.0001$ ). La variabile dipendente era significativamente influenzata da creatinina ( $F=17.082$ ,  $p<0.0001$ ), cotinina ( $F=24.472$ ,  $p<0.0001$ ) e da tutti i polimorfismi ( $F=6.830$ ,  $p=0.01$  per *GSTM1*;  $F=5.303$ ,  $p=0.023$  per *GSTT1*;  $F = 3.995$ ,  $p = 0.048$  per *GSTAI*), con interazioni significative tra *GSTM1* e *GSTT1* ( $F=7.826$ ,  $p=0.006$ ) e tra *GSTM1* e *GSTAI* ( $F=4.435$ ,  $p=0.037$ ), come presentato nelle Figure 1 e 2. Le medie [e deviazioni standard] geometriche marginali stimate (per concentrazioni medie di creatinina e cotinina pari a 1.62 g/L and 0.54 mg/L, rispettivamente) erano di 0.51 [1.34] and 1.46 [1.29] µg/L nei soggetti *GSTM1null* e *GSTM1pos*, 0.56 [1.42] e 1.34 [1.15] µg/L nei soggetti *GSTT1null* e *GSTT1pos*, e 0.58 [1.45] and 1.29 [1.11] µg/L nei soggetti con genotipo *GSTAI\*B\*B* ed in quelli con almeno un allele *GSTAI\*A* allele. Nessuno dei polimorfismi GST indagati interferiva significativamente con l'escrezione di *t,t*-MA.

**Discussione.** I livelli di esposizione ambientale a benzene nel gruppo dei taxisti e dei vigili urbani è già stata descritta (113, 135). Il gruppo dei benzinai era esposto a concentrazioni ambientali mediane pari a 38.3 µg/m<sup>3</sup>, valore simile a quanto già riportato in precedenza (medie comprese tra 23.5 e 61 µg/m<sup>3</sup>; 111, 114, 146). In accordo con studi simili su gruppi esposti a basse dosi di benzene (111), la nostra indagine evidenzia un'assenza di coerenza tra dati di monitoraggio biologico ed ambientale.

Sebbene i di esposizione osservati tra i benzinai siano superiori a quelli determinati per taxisti e vigili urbani (circa  $6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), i taxisti eliminavano livelli significativamente maggiori di metaboliti del benzene, rispetto a vigili urbani e benzinai ( $p < 0.0001$ ). In ogni caso, è di rilievo che, malgrado tali differenze, nei gruppi studiati le concentrazioni degli indicatori di esposizione cadevano all'interno degli intervalli di riferimento della popolazione generale (147). Le differenze nei livelli degli indicatori di esposizione possono essere spiegate da un orario di lavoro più prolungato da parte dei taxisti (11 ore) e da concentrazioni di benzene significativamente più elevate rilevate all'interno dei taxi (113). Misure di prevenzione primaria, come la già ricordata riduzione del tenore di benzene all'interno dei carburanti ( $<1\%$ ), l'installazione di dispositivi di estrazione dei vapori di solvente sulle pompe di benzina ed il crescente numero di stazioni self-service hanno considerevolmente ridotto l'esposizione a benzene nei benzinai, in confronto al recente passato (114). L'abitudine tabagica rappresenta il fattore di confondimento più importante nel monitoraggio biologico dell'esposizione a benzene, specialmente a livelli di esposizione bassi e molto bassi. La prevalenza di fumatori era maggiore tra i taxisti (40%) rispetto ai vigili urbani (20%) e ai benzinai (33%); la metà dei taxisti fumava più di 15 sigarette/die. Inoltre, i taxisti hanno dichiarato di aver fumato nell'intervallo tra una corsa e l'altra, mentre per i benzinai è vietato fumare vicino le pompe di benzina, e per i vigili che operano in ufficio non è consentito fumare liberamente durante il turno. Contrariamente all'atteso, non è stato osservato un marcato effetto del fumo sugli indicatori di stress ossidativo, in accordo con quanto recentemente descritto in un nostro studio sui valori di riferimento degli indicatori di danno ossidativo alla guanina (148) ed in lavoratori esposti a stirene (149). Risultati simili sono stati riportati da Kimura et al. (150) e Harman et al. (151), mentre altri autori sono giunti a conclusioni diverse (152). Il nostro studio riporta per la prima

volta l'applicazione di un pannello di indicatori urinari di ossidazione alla guanina, per caratterizzare l'entità dello stress ossidativo in lavoratori professionalmente esposti a benzene. Questi indicatori possono essere generati dall'ossidazione sul C8 della guanina contenuta in DNA, RNA e pool dei nucleotidi e dalla specificità ed efficienza di vari sistemi della riparazione. Dal punto di vista tossicologico, l'interesse per questi indicatori risiede nella loro potenziale utilità come indicatori di esposizione ad agenti ossidanti (153), come è il benzene. I loro livelli urinari possono integrare l'intensità dell'esposizione, le capacità antiossidanti endogene e la variabilità inter-individuale nell'efficienza dei sistemi di riparazione del danno ossidativo al DNA (e all'RNA). Lo studio dimostra una correlazione significativa tra gli indicatori di esposizione al benzene - *S*-PMA e *t,t*-MA- e gli indicatori di danno ossidativo alla guanina contenuta nel DNA e nel pool dei 2'deossiribonucleotidi (8-oxodGuo) e nell'RNA (8-oxoGuo), in quest'ultimo caso con modulazione da parte del polimorfismo genetico *NQO1*. Il dato è coerente con i risultati di numerosi studi dimostranti un'associazione positiva tra esposizione a benzene e danno ossidativo al DNA (118, 119, 123, 124). In uno di questi, in particolare, è stata descritta una correlazione significativa tra *S*-PMA e 8-oxodGuo determinata su DNA linfocitario (119), significativamente modulata dal polimorfismo genetico *NQO1*, enzima chiave nella detossificazione dei chinoni. Nel nostro studio, l'8-oxoGuo – di probabile origine dalla riparazione/turnover dell'RNA – è risultato l'indicatore più sensibile di danno ossidativo associato con l'esposizione a benzene. La localizzazione citoplasmatica dell'RNA e le sue caratteristiche strutturali (acido nucleico monofilamento, le cui basi azotate non sono protette da ponti idrogeno, nè da proteine strutturali) (130) lo rendono più suscettibile al danno ossidativo, rispetto al DNA. Su lavoratori esposti a stirene, abbiamo recentemente evidenziato concentrazioni urinarie più elevate di 8-oxoGuo, rispetto ad un gruppo di controllo (149). L'ipotesi è

che le monoossigenasi citocromo P450 dipendenti coinvolte nel metabolismo degli areni stirene e del benzene, localizzate a livello del reticolo endoplasmatico liscio, possano essere responsabili della generazione di specie reattive dell'ossigeno, che ossidano l'RNA citoplasmatico. Non abbiamo trovato associazioni significative tra esposizione a benzene e livelli urinari di 8-oxoGua, indicatore derivante dall'ossidazione della guanina più abbondante a livello urinario e caratterizzato dalla più ampia variabilità intra- ed inter-individuale (125), probabilmente anche a causa di fattori interferenti, tra cui il polimorfismo genetico dell'enzima 8-oidrossiguanina DNA N-glicosilasi 1 (*hOGG1*). I modelli di regressione lineare applicati per valutare il contributo di vari predittori alla variabilità degli indicatori di ossidazione alla guanina, tra cui la creatinina urinaria (154), hanno dimostrato, analogamente a quanto già osservato nel caso dell'esposizione a stirene (149), che la creatininuria è il principale predittore, da cui dipende il 49%, il 43% ed il 9% della varianza di 8-oxodGuo, 8-oxoGuo e 8-oxoGua, rispettivamente. L'analisi ha inoltre dimostrato un'associazione significativa tra danno ossidativo alla guanina e livelli degli indicatori di esposizione a benzene, spieganti il 3% ed il 10% circa della varianza di, rispettivamente, 8-oxodGuo e 8-oxoGuo. Nel caso dell'esposizione a stirene, sebbene a livelli considerevolmente più elevati, abbiamo ottenuto risultati simili, gli indicatori di esposizione spiegando circa il 2-3% della variabilità di 8-oxodGuo ed 8-oxoGuo (149). La capacità del benzene di generare ROS ed indurre danno ossidativo agli acidi nucleici è ben nota e tale meccanismo è ritenuto essere responsabile della tossicità del benzene, anche a bassi livelli di esposizione. Malgrado la somiglianza dal punto di vista strutturale, benzene e stirene presentano una differente potenzialità in senso genotossico e cancerogeno. L'analisi di regressione nel campione stratificato per abitudine tabagica ha dimostrato che *S*-PMA è superiore a *t,t*-MA come predittore dell'escrezione degli indicatori di ossidazione. Abbiamo

confermato il ruolo modulante del polimorfismo genetico *GSTM1* sull'escrezione di S-PMA, osservato per la prima volta nella casistica dei taxisti della città di Parma (113). Questa modulazione è stata osservata anche in un'ampia casistica di soggetti esposti ad un'ampio intervallo di concentrazioni di benzene (155). L'ampiezza del campione ci ha consentito di indagare anche il ruolo del polimorfismo genetico di *GSTAI* e *GSTT1* e le interazioni tra i vari isoenzimi GST. Abbiamo così potuto confermare anche la modulazione del polimorfismo *GSTAI* sull'escrezione di S-PMA, già preliminarmente ipotizzata nello studio sui taxisti e non ancora riportata da altri Autori. Contrariamente a quanto osservato in precedenza, probabilmente per insufficiente potenza statistica, ma in accordo con quanto segnalato da altri Autori (136, 137), abbiamo potuto evidenziare un'attività modulante anche del polimorfismo *GSTT1*. Sebbene abbiamo precedentemente ipotizzato che l'attività GSTT1-1 possa essere implicata nella detossificazione del benzene ossido a concentrazioni di benzene più elevate, questi risultati confermano che l'enzima è attivo in un ampio intervallo di concentrazioni (123, 155). Le interazioni tra i polimorfismi *GSTM1* e *GSTT1* e *GSTAI* sono presentati nelle Figure 1 e 2. I soggetti privi di attività GSTM1-1 e GSTT1-1 (genotipi *GSTM1null* e *GSTT1null*) eliminano i livelli minori di S-PMA, così come i soggetti privi di attività GSTM1-1 ed esprimenti il più basso rapporto GSTA1-1/GSTA2-2 a livello epatico (144), mentre i soggetti *GSTM1pos* esprimenti GSTT1-1 e i più alti livelli di GSTA1-1 eliminavano le maggiori concentrazioni di metabolita. In soggetti defettivi per un'attività, le altre sono efficacemente vicarianti. Non possiamo escludere che altre glutatione S-transferasi possano essere coinvolte nella biotrasformazione del benzene ossido a S-PMA.

In conclusione, i risultati ottenuti dimostrano che l'esposizione a benzene è associata ad un danno ossidativo alla guanina dimostrabile con il dosaggio di indicatori biologici

urinari. L'associazione è debole per le caratteristiche intrinseche degli indicatori utilizzati ed è possibile che fattori ambientali e personali diversi dal benzene possano essere responsabili delle variazioni negli indicatori di danno ossidativo. L'RNA sembra essere maggiormente vulnerabile rispetto al DNA al danno ossidativo indotto dalle specie reattive dell'ossigeno generate dal metabolismo del benzene. Lo studio conferma il ruolo protettivo svolto dall'enzima NADPH:chinone ossidoreduttasi 1 verso le specie chinoniche generate dal metabolismo del benzene, e dimostra infine un significativo effetto modulante dei polimorfismi *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTA1* sull'escrezione dell'S-PMA a bassi livelli di esposizione, con una significativa interazione tra i polimorfismi *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTA1*. In soggetti defettivi per una di tali attività GST, le altre sembrano efficacemente vicarianti.

## 6 CONCLUSIONI FINALI

Le esperienze accumulate nei due studi completati nel corso del dottorato di ricerca consentono di trarre le seguenti conclusioni sull'applicazione dei polimorfismi metabolici per lo studio delle interazioni gene-ambiente, a fini preventivi:

1. La valutazione dei polimorfismi metabolici in studi epidemiologici dotati di adeguata potenza statistica, produce risultati che, sebbene non immediatamente trasferibili per le ragioni esposte in Introduzione a fini preventivi sotto forma di test genetici, contribuiscono significativamente alla comprensione di meccanismi di sviluppo della patologia degenerativa e multifattoriale.
2. A differenza dei polimorfismi genetici in senso lato, utilizzabili in studi di associazione *genomewide*, i polimorfismi metabolici, per loro stessa natura, devono essere utilizzati in studi basati su specifiche ipotesi formulate *a priori*. Ciò implica un'accurata conoscenza delle conseguenze funzionali del polimorfismo sulla via metabolica pertinente e delle modalità con cui la modulazione del fattore di rischio, ed eventualmente degli effetti conseguenti all'interazione enzima-substrato, tenendo conto anche di altre coesposizioni interferenti o confondenti, può evolvere in senso fisiopatologico fino allo sviluppo di malattia.
3. Lo studio del ruolo dei polimorfismi metabolici come modulatori del rischio di malattia tramite indagini di tipo retrospettivo caso-controllo, benchè utile per la generazione di ipotesi da validare successivamente, è limitato dai seguenti fattori:
  - 3.1 Bassa penetranza dei polimorfismi genetici, ossia delle relazioni tra gli stessi ed i fenotipi ad essi associati.

- 3.2 Parzialità della ricostruzione dell'esposizione ai fattori di rischio che, nel caso dei polimorfismi metabolici, è critica per la specificità delle interazioni enzima-substrato;
- 3.3 Difficoltà analoghe esistono nella caratterizzazione di altre esposizioni di tipo ambientale-professionale che possono avere effetti interferenti (inibizione-potenziamento) sull'attività enzimatica di cui si studia il polimorfismo;
- 3.4 Molteplicità dei passaggi fisiopatologici intermedi tra l'interazione enzima-substrato e gli effetti biologici che conducono allo sviluppo della malattia che possono confondere i risultati delle associazioni trovate tra polimorfismo e malattia.
4. In conseguenza delle difficoltà di cui ai punti 3.2 e 3.3, potrebbe essere lecito lo studio della pura associazione tra malattia e polimorfismi, che potrebbero essere utilizzati come marcatori indiretti di esposizioni pertinenti. In tal caso, tuttavia, l'assenza di controllo dei fattori di rischio e delle coesposizioni pertinenti, conduce a stime di rischio che risentono delle prevalenze di questi nel gruppo studiato e quindi soggette ad ampia variabilità.
5. Tutte le limitazioni riportate al punto 3, con eccezione della penetranza, che è una caratteristica intrinseca del polimorfismo, possono essere attenuate in situazioni sperimentali *in vitro* (studi su colture cellulari) ed *in vivo* (studi sperimentali, semi-sperimentali) o in studi trasversali o prospettici, in cui vengano testate ipotesi specifiche di interazione enzima-substrato (modificazione degli indicatori di esposizione), con adeguato controllo delle co-esposizioni interferenti/confondenti, e possibilmente anche di indicatori di effetto pertinenti.
6. Lo studio di più polimorfismi metabolici, coinvolti in via metaboliche ridondanti per lo stesso substrato (esempio delle glutatione S-transferasi) o in tappe successive

della biotrasformazione del fattore di rischio (glutathione S-transferasi e NADPH:chinone ossidoreduttasi 1), può rafforzare la plausibilità biologica delle associazioni evidenziate.

## 7 BIBLIOGRAFIA

1. NRC, National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research *Environ. Health Perspect.* 1987; 74:3–9.
2. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al.; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409: 860-921.
3. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The Human Genome Project: lessons from large-scale biology. *Science.* 2003; 300: 286-90.
4. Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, et al.; Mouse Genome Sequencing Consortium. Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol.* 2009; 7: e1000112.
5. Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, Kellis M, Lindblad-Toh K, Lander ES. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104: 19428-33.
6. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science.* 2001; 291: 1304-51.
7. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al.; International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409: 860-921.
8. Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 1999; 283: 1482-8.
9. Kidd JM, Cooper GM, Donahue WF, et al. Mapping and sequencing of structural variation from eight human genomes. *Nature.* 2008; 453: 56-64.
10. International HapMap Consortium. A haplotype map of the human genome. *Nature.* 2005; 437: 1299-320.

11. Nebert DW. Suggestions for the nomenclature of human alleles: relevance to ecogenetics, pharmacogenetics and molecular epidemiology. *Pharmacogenetics*. 2000; 10: 279-90
12. Roses AD. Pharmacogenetics and future drug development and delivery. *Lancet*. 2000; 355: 1358-61.
13. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest*. 2008; 118: 1590-605.
14. Hindorff LA, Sethupathy P, Junkins HA, Ramos EM, Mehta JP, Collins FS, Manolio TA. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106: 9362-7.
15. Cook EH Jr, Scherer SW. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature*. 2008; 455: 919-23.
16. Kalow W. The Pennsylvania State University College of Medicine 1990 Bernard B. Brodie Lecture. Pharmacogenetics: past and future. *Life Sci*. 1990; 47: 1385-97.
17. Kalow W, Gunn DR. Some statistical data on atypical cholinesterase of human serum. *Ann Hum Genet*. 1959; 23: 239-50.
18. Kalow W, Gunn DR. The relation between dose of succinylcholine and duration of apnea in man. *J Pharmacol Exp Ther*. 1957; 120: 203-14.
19. Evans DA, Manley KA, McKusick VA. Genetic control of isoniazid metabolism in man. *Br Med J*. 1960; 2: 485-91.
20. Timbrell JA, Harland SJ, Facchini V. Polymorphic acetylation of hydralazine. *Clin Pharmacol Ther*. 1980; 28: 350-5.

21. Reidenberg MM, Drayer DE, Levy M, Warner H. Polymorphic acetylation of procainamide in man. *Clin Pharmacol Ther.* 1975; 17: 722-30.
22. Drayer DE, Reidenberg MM. Clinical consequences of polymorphic acetylation of basic drugs. *Clin Pharmacol Ther.* 1977; 22: 251-8.
23. Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet.* 1977; 2: 584-6.
24. Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol.* 1979; 16: 183-7.
25. Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjöqvist F, Ingelman-Sundberg M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 11825-9.
26. Yang SK, McCourt DW, Roller PP, Gelboin HV. Enzymatic conversion of benzo(a)pyrene leading predominantly to the diol-epoxide r-7,t-8-dihydroxy-t-9,10-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene through a single enantiomer of r-7, t-8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976; 73: 2594-8.
27. Kim JH, Stansbury KH, Walker NJ, Trush MA, Strickland PT, Sutter TR. Metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis.* 1998; 19: 1847-53.
28. Nebert DW, Dalton TP. The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 947-60.

29. Irigaray P, Belpomme D. Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens. *Carcinogenesis*. 2010; 31: 135-48.
30. Wiencke JK, Pemble SE, Ketterer B and Kelsey KT. Gene deletion of glutathione S-transferase 9: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1995; 4: 253-259.
31. Anders MW e Dekant W. Glutathione dependent bioactivation of haloalkenes. *Annu Rev. Pharmacol Toxicol*. 1998; 38: 501-37.
32. Bruning T, Lammert M, Kempkes M et al. Influence of polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 for risk of renal cell cancer in workers with long term high occupational exposure to trichloroethene. *Arch. Toxicol*. 1997; 71: 596-99.
33. Puga A, Nebert DW, McKinnon RA, Menon AG. Genetic polymorphisms in human drug metabolising enzymes: potential uses of reverse genetics to identify genes of toxicological relevance. *Crit. Rev. Toxicol*. 1997; 27: 199-222.
34. Vineis P and Schulte P. Scientific and ethical aspects of genetic screening of workers to cancer risk: the case of the N-acetyltransferase phenotype. *J. Cancer Epidemiol*. 1995; 48: 189-197.
35. Hayes RB, Bi W, Rothman N, et al. N-acetylation phenotype and genotype and risk of bladder cancer in benzidine-exposed workers. *Carcinogenesis*. 1993; 14: 675-78..
36. Rothman N, Bhatnagar VK, Hayes RB, et al. The impact of interindividual variation in NAT2 activity on benzidine urinary metabolites and urothelial

- DNA adducts in exposed workers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996; 93: 5084-89.
37. Lang NP, Butler MA, Massengill J, et al. Rapid metabolic phenotypes for acetyl transferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1994; 3: 675-82.
  38. Bell DA, Stephens E, Castranio T, et al. Polyadenylation polymorphism in the N-acetyl transferase gene 1 (NAT1) increases risk of colorectal cancer. *Cancer. Res.* 1995; 5: 3537-42.
  39. Nakachi K, Imai K, Hayashi S, et al. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res.* 1991; 51: 5177-80.
  40. Nakachi K, Imai K, Hayashi S, et al. Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. *Cancer Res.* 1993; 53: 2994-99.
  41. De Palma G, Mozzoni P, Mutti A, Calzetti S, Negrotti A. Case-control study of interactions between genetic and environmental factors in Parkinson's disease. *Lancet.* 1998; 352: 1986-7.
  42. Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, et al.; Geoparkinson Study Group. Gene-environment interactions in parkinsonism and Parkinson's disease: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med.* 2007; 64: 673-80.
  43. Vainio H. Biomarkers in the identification of risks, especially with regard to susceptible persons and subgroups. *Scand. J. Work Environ. Health.* 1999; 25: 1-3.

44. Vineis P and Schulte P. Scientific and ethical aspects of genetic screening of workers to cancer risk: the case of the N-acetyltransferase phenotype. *J. Cancer Epidemiol.* 1995; 48:189-97.
45. McLellan RA, Oscarson M, Alexandrie AK, Seidegård J, Evans DA, Rannug A, Ingelman-Sundberg M. Characterization of a human glutathione S-transferase mu cluster containing a duplicated GSTM1 gene that causes ultrarapid enzyme activity. *Mol Pharmacol.* 1997; 52: 958-65
46. ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature.* 2007; 447: 799-816.
47. Parker SC, Hansen L, Abaan HO, Tullius TD, Margulies EH. Local DNA topography correlates with functional noncoding regions of the human genome. *Science.* 2009; 324: 389-92.
48. Feinberg AP. Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature.* 2007; 447: 433-40.
49. De Palma G, Mozzoni P. New molecular indicators for the prevention of tumor and degenerative diseases: anomalous DNA methylation. *G Ital Med Lav Ergon.* 2009; 31: 51-3.
50. Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med.* 2008; 358: 1148-59.
51. Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, et al. Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA.* 2008; 299: 2877-83.
52. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009; 136: 642-55.

53. Bartels CL, Tsongalis GJ. [MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2010; 68: 263-72.
54. Xiao C, Rajewsky K. MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*. 2009; 136: 26-36.
55. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:199-227.
56. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*. 2009; 457: 426-33.
57. Vineis P, Bartsch, H, Caporaso N, et al. Genetically based N-acetyltransferase metabolic polymorphism and low-level environmental exposure to carcinogens. *Nature*. 1994; 369: 154-56.
58. Rothman N, Steluart WF, Caporaso NE e Hayes RB. Misclassification of genetic susceptibility biomarkers: implications for case-control studies and cross-population comparisons. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1993; 2: 299-303.
59. Van Damme K and Casteleyn L. Ethical, social and scientific problems related to the application of genetic screening and genetic monitoring for workers in the context of a european approach to health and safety at work. *Med Lav*. 1998; 89: S1- 72.
60. De Palma G, Dick FD, Calzetti S, Scott NW, Prescott GJ, Osborne A, Haites N, Mozzoni P, Negrotti A, Scaglioni A, Mutti A; Geoparkinson Study Group. A case-control study of Parkinson's disease and tobacco use: gene-tobacco interactions. *Mov Disord*. 2010; 25: 912-9.
61. de Lau LM, Breteler MM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol*. 2006; 5: 525-35.

62. Quik M. Smoking, nicotine and Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 2004; 27: 561-8.
63. Sugita M, Izuno T, Tatemichi M, Otahara Y. Meta-analysis for epidemiologic studies on the relationship between smoking and Parkinson's disease. *J Epidemiol* 2001; 11: 87-9.
64. Ritz B, Ascherio A, Checkoway H, Marder KS, Nelson LM, Rocca WA, et al. Pooled analysis of tobacco use and risk of Parkinson disease. *Arch Neurol* 2007; 64: 990-7.
65. Allam MF. Smoking and Parkinson's disease: systematic review of prospective studies. *Mov Disord.* 2004; 19: 614-21.
66. Thacker EL, O'Reilly EJ, Weisskopf MG, Chen H, Schwarzschild MA, McCullough ML, et al. Temporal relationship between cigarette smoking and risk of Parkinson disease. *Neurology* 2007; 68: 764-8.
67. De Palma G, Mozzoni P, Mutti A, Calzetti S, Negrotti A. Case-control study of interactions between genetic and environmental factors in Parkinson's disease. *Lancet* 1998; 352: 1986-7
68. Deng Y, Newman B, Dunne MP, Silburn PA, Mellick GD. Case-only study of interactions between genetic polymorphisms of GSTM1, P1, T1 and Z1 and smoking in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2004; 366: 326-31.
69. Wahner AD, Glatt CE, Bronstein JM, Ritz B. Glutathione S-transferase mu, omega, pi, and theta class variants and smoking in Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2007; 413: 274-8.
70. Kelada SN, Stapleton PL, Farin FM, et al. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and Parkinson's disease. *Neurosci Lett.* 2003; 337: 5-8.

71. Kelada SN, Costa-Mallen P, Costa LG, et al. Gender difference in the interaction of smoking and monoamine oxidase B intron 13 genotype in Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 2002; 23: 515-9.
72. Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, et al. Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med* 2007; 64: 666-72.
73. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, et al. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992; 55: 181-4.
74. Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, et al. Gene-environment interactions in parkinsonism and Parkinson's disease: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med* 2007; 64: 673-80.
75. Smits KM, Benhamou S, Garte S, et al. Association of metabolic gene polymorphisms with tobacco consumption in healthy controls. *Int J Cancer* 2004; 110: 266-70.
76. Inskip A, Elexperu-Camiruaga J, Buxton N, et al. Identification of polymorphism at the glutathione S-transferase, GSTM3 locus: evidence for linkage with GSTM1\*A. *Biochem J* 1995; 312: 713-6.
77. Barr CL, Xu C, Kroft J, et al. Haplotype study of three polymorphisms at the dopamine transporter locus confirm linkage to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 2001; 49: 333-9.
78. VanNess SH, Owens MJ, Kilts CD. The variable number of tandem repeats element in DAT1 regulates in vitro dopamine transporter density. *BMC Genet*. 2005; 6: 55.

79. Fuke S, Suo S, Takahashi N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S. The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *Pharmacogenomics J* 2001; 1: 152-6.
80. Hotamisligil GS, Breakefield XO. Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *Am J Hum Genet.* 1991; 49:383-92.
81. Menegon A, Board PG, Blackburn AC, Mellick GD, Le Couteur DG. Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet.* 1998; 352: 1344-6.
82. Comings DE. Molecular heterosis as the explanation for the controversy about the effect of the DRD2 gene on dopamine D2 receptor density. *Mol Psychiatry* 1999; 4: 213-5.
83. Hirvonen A. Polymorphic NATs and cancer predisposition. Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer. Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J, Boffetta P (Eds) IARC Scientific Publications no. 148. International Agency for research on Cancer, Lyon, 1999.
84. Botto LD, Khoury MJ. Commentary: facing the challenge of gene-environment interaction: the two-by-four table and beyond. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 1016-20.
85. Rothman KJ. No adjustments are needed for multiple comparisons. *Epidemiology* 1990; 1: 43-6.
86. Leffingwell JC In: Davis DL and Nielsen MT, editors. *Tobacco: Production, Chemistry and Technology*; Malden, Mass: Oxford Press; 1999: 265-84.

87. Li MD. Identifying susceptibility loci for nicotine dependence: 2008 update based on recent genome-wide linkage analyses. *Hum Genet.* 2008; 123: 119-31.
88. Fowler JS, Logan J, Wang GJ, Volkow ND. Monoamine oxidase and cigarette smoking. *Neurotoxicology* 2003; 24: 75-82.
89. Orelund L, Fowler CJ, Schalling D. Low platelet monoamine oxidase activity in cigarette smokers. *Life Sci* 1981; 29: 2511-8.
90. Fowler JS, Volkow ND, Logan J, et al. An acute dose of nicotine does not inhibit MAOB in baboon brain in vivo. *Life Sci* 1998; 63: PL19-23.
91. Fowler JS, Wang GJ, Volkow ND, et al. Maintenance of brain monoamine oxidase B inhibition in smokers after overnight cigarette abstinence. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 1864-6.
92. Castagnoli K, Steyn SJ, Magnin G, et al. Studies on the interactions of tobacco leaf and tobacco smoke constituents and monoamine oxidase. *Neurotox Res.* 2002; 4: 151-60.
93. Khalil AA, Davies B, Castagnoli N Jr. Isolation and characterization of a monoamine oxidase B selective inhibitor from tobacco smoke. *Bioorg Med Chem* 2006;14: 3392-8.
94. Baez S, Segura-Aguilar J, Widersten M, Johansson AS, Mannervik B. Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochem J* 1997; 324: 25-8.
95. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer

- chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30: 445-600.
96. Carder PJ, Hume R, Fryer AA, Strange RC, Lauder J, Bell JE. Glutathione S-transferase in human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1990; 16: 293-303.
97. Robertson IG, Guthenberg C, Mannervik B, Jernström B. Differences in stereoselectivity and catalytic efficiency of three human glutathione transferases in the conjugation of glutathione with 7 beta,8 alpha-dihydroxy-9 alpha,10 alpha-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. *Cancer Res.* 1986; 46: 2220-4.
98. Pal A, Desai DH, Amin S, Srivastava SK, Hu X, Herzog C, Zimniak P, Singh SV. Location of the epoxide function determines specificity of the allelic variants of human glutathione transferase Pi toward benzo[c]chrysene diol epoxide isomers. *FEBS Lett* 2000; 486: 163-6.
99. Arriagada C, Paris I, Sanchez de las Matas MJ, et al. On the neurotoxicity mechanism of leukoaminochrome o-semiquinone radical derived from dopamine oxidation: mitochondria damage, necrosis, and hydroxyl radical formation. *Neurobiol Dis.* 2004; 16: 468-77.
100. Hand PA, Inskip A, Gilford J, et al. Allelism at the glutathione S-transferase GSTM3 locus: interactions with GSTM1 and GSTT1 as risk factors for astrocytoma. *Carcinogenesis* 1996; 17: 1919-22.
101. Segura-Aguilar J, Baez S, Widersten M, Welch CJ, Mannervik B. Human class Mu glutathione transferases, in particular isoenzyme M2-2, catalyze detoxication of the dopamine metabolite aminochrome. *J Biol Chem* 1997; 272: 5727-31.

102. Husain A, Zhang X, Doll MA, States JC, Barker DF, Hein DW. Identification of N-acetyltransferase 2 (NAT2) transcription start sites and quantitation of NAT2-specific mRNA in human tissues. *Drug Metab Dispos* 2007; 35: 721-7.
103. Grant DM, Goodfellow GH, Sugamori K, Durette K. Pharmacogenetics of the human arylamine N-acetyltransferases. *Pharmacology* 2000; 61: 204-11.
104. Muscat JE, Pittman B, Kleinman W, Lazarus P, Stellman SD, Richie JP Jr. Comparison of CYP1A2 and NAT2 phenotypes between black and white smokers. *Biochem Pharmacol* 2008; 76: 929-37.
105. Borlak J, Reamon-Buettner SM. N-acetyltransferase 2 (NAT2) gene polymorphisms in colon and lung cancer patients. *BMC Med Genet* 2006; 7: 58.
106. Grundmann M, Earl CD, Sautter J, Henze C, Oertel WH, Bandmann O. Slow N-acetyltransferase 2 status leads to enhanced intrastriatal dopamine depletion in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Exp Neurol* 2004; 187: 199-202.
107. Bandmann O, Vaughan J, Holmans PA, Marsden CD, Wood NW. Toxins, genetics, and Parkinson's disease: the role of N-acetyltransferase 2. *Adv Neurol* 1999; 80: 199-204.
108. Manini P, De Palma G, Andreoli R, et al. Occupational exposure to low levels of benzene: Biomarkers of exposure and nucleic acid oxidation and their modulation by polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicol Lett.* 2010; 193: 229-35.
109. IARC. Benzene. In: Some industrial chemicals and dyestuffs IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. 1982; 29: 93-148.

- 110.WHO. Regional Office for Europe. Air quality guidelines for Europe, second Edition, WHO Regional Publications, European series. 2000; 91:62-6.
- 111.Fustinoni S., Consonni D., Campo L. et al. Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking, and genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005; 14: 2237-44.
- 112.Bono R., Traversi D., Maestri L. et al. Urban air and tobacco smoke in benzene exposure in a cohort of traffic policemen. *Chem. Biol. Interact.* 2005; 153-154: 239-42.
- 113.Manini P., De Palma G., Andreoli R. et al. Environmental and biological monitoring of benzene exposure in a cohort of Italian taxi drivers. *Toxicol. Lett.* 2006; 167: 142-51.
- 114.Carrieri M., Bonfiglio E., Scapellato M.L., et al. Comparison of exposure assessment methods in occupational exposure to benzene in gasoline filling-station attendants. *Toxicol. Lett.* 2006; 162: 146-52.
- 115.SIMLII. Linee guida per il monitoraggio biologico. Mutti, A. (coordinatore), De Palma, G., Manini, P., et al. PI-ME Editrice, Pavia. 2006.
- 116.Barreto G., Madureira D., Capani F., et al. The role of catechols and free radicals in benzene toxicity: an oxidative DNA damage pathway. *Environ. Mol. Mutagen.* 2009; 50: 771-80.
- 117.Liu L., Zhang Q., Feng J., et al. The study of DNA oxidative damage in benzene-exposed workers. *Mutat. Res.* 1996; 370: 145-50.
- 118.Loft S., Poulsen H.E., Vistisen K., Knudsen L.E. Increased urinary excretion of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a biomarker of oxidative DNA damage, in urban bus drivers. *Mutat. Res.* 1999; 441: 11-19.

- 119.Sørensen M., Skov H., Autrup H., Hertel O., Loft S. Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolism genes. *Sci. Total Environ.* 2003; 309: 69-80.
- 120.Buthbumrun N., Mahidol C., Navasumrit P., et al. Oxidative DNA damage and influence of genetic polymorphisms among urban and rural schoolchildren exposed to benzene. *Chem. Biol. Interact.* 2008; 172: 185- 94.
- 121.ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis.* 2002; 23: 2129-33.
- 122.Collins A.R., Cadet J., Möller L., Poulsen H.E., Viña J. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch. Biochem. Biophys.* 2004; 423: 57-65.
- 123.Avogbe P.H., Ayi-Fanou L., Autrup H., et al. Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage. *Carcinogenesis.* 2005; 26: 613-20.
- 124.Fracasso M.E., Doria D., Bartolucci G.B., et al. Low air levels of benzene: Correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects. *Toxicol. Lett.* 2010; 192: 22-8
- 125.Andreoli R., Manini P., De Palma G., et al. Quantitative determination of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 8-oxo-7,8-dihydroguanosine, and their non-oxidized forms: daily concentration profile in healthy volunteers. *Biomarkers* 2010; 15: 221-31.
- 126.Weimann A., Belling D., Poulsen H.E. Quantification of 8-oxoguanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human

- urine by highperformance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30: E7.
127. Tsuzuki T., Egashira A., Igarashi H., et al. Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGuoTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 11456-61.
128. Bessho T., Tano K., Kasai H., Ohtsuka E., Nishimura S. Evidence for two DNA repair enzymes for 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in human cells. *J. Biol. Chem.* 1993; 268, 19416-21.
129. Patel P.R., Bevan R.J., Mistry N., Lunec J. Evidence of oligonucleotides containing 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 42: 552-8.
130. Nunomura A., Honda K., Takeda A., et al. Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *J. Biomed. Biotechnol.* 2006; 2006: 82323.
131. Cooke M.S., Evans M.D., Dizdaroglu M., Lunec J.. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003; 17: 1195-214.
132. Evans M.D., Cooke M.S. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays.* 2004; 26: 533-42.
133. Loft S., Svoboda P., Kasai H. et al. Prospective study on 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion and the risk of lung cancer. *Carcinogenesis.* 2006; 27: 1245-50.
134. Kim S., Vermeulen R., Waidyanatha S. et al. Modeling human metabolism of benzene following occupational and environmental exposures. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2006; 15: 2246-52.
135. Manini P., De Palma G., Andreoli R. et al. Biological monitoring of low benzene exposure in Italian traffic policemen. *Toxicol. Lett.* 2008; 181: 25-30.

- 136.Sørensen M., Poole J., Autrup H. et al. Benzene exposure assessed by metabolite excretion in Estonian oil shale mineworkers: influence of glutathione S-transferase polymorfisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004; 13: 1729-35.
- 137.Qu Q., Shore R., Li G. et al. Biomarkers of benzene: urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. *Chem. Biol. Interact.* 2005; 153-154: 85-95.
- 138.Ross D. Functions and distribution of NQO1 in human bone marrow: potential clues to benzene toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 2005; 153-154: 137-46.
- 139.Rothman N., Li G.L., Dosemeci M., et al. Hematotoxicity among Chinese workers heavily exposed to benzene. *Am. J. Ind. Med.* 1996; 29: 236-46.
- 140.Kroll M.H., Chesler R., Hagenhuber C., Blank D.W., Kestner J., Rawe M. Automated determination of urinary creatinine without sample dilution: theory and practice. *Clin. Chem.* 1986; 32: 446-52.
- 141.ACGIH, 2004. Threshold Limit Values (TLVs) for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices (BEIs), American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati (OH).
- 142.Schulz, W.A., Krummeck, A., Rosinger, I., et al. Increased frequency of a null-allele for NAD(P)H: quinone oxidoreductase in patients with urological malignancies. *Pharmacogenetics.* 1997; 7: 235-9.
- 143.Arand M., Muhlbauer R., Hengstler J., Jager E., Fuchs J., Winkler R., Oesch F. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal. Biochem.* 1996; 236: 184-6.

144. Coles, B.F., Morel, F., Rauch, et al. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2. *Pharmacogenetics*. 2001; 11: 663-9.
145. Garte S., Gaspari L., Alexandrie A.K., et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001; 10: 1239-48.
146. Lovreglio P., Barbieri A., Carrieri M., et al. Validity of new biomarkers of internal dose for use in the biological monitoring of occupational and environmental exposure to low concentrations of benzene and toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2010; 83: 341-56.
147. BIOLIND.NET, 2008, available at: <http://www.biolind.net>
148. Andreoli R, Mutti A, Goldoni M, Manini P, Apostoli P, De Palma G. Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (2'-deoxy)ribonucleotides and nucleic acids. *Free Radic Biol Med*. 2011; 50: 254-61.
149. Manini P., De Palma G., Andreoli R., et al. Biomarkers of nucleic acid oxidation, polymorphism in, and expression of, hOGG1 gene in styrene-exposed workers. *Toxicol. Lett*. 2009; 190: 41-7.
150. Kimura S., Yamauchi H., Iwamoto M., Sera K., Ogino K. Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxyguanine in healthy Japanese people. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol*. 2006; 98, 496-502.
151. Harman S.M., Liang L., Tsitouras D., et al. Urinary excretion of three nucleic acid oxidation adducts and isoprostane F<sub>2α</sub> measured by liquid chromatography-mass spectrometry in smokers, exsmokers, and never smokers. *Free Rad. Biol. Med*. 2003; 35: 1301-9.

152. Irie M., Tamae K., Iwamoto-Tanaka N., Kasai H. Occupational and lifestyle factors and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer Sci.* 2005; 96: 600-6.
153. Pilger A., Rudiger H.W. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2006; 80: 1-15.
154. Barr D., Wilder L.C., Caudill S.P., Gonzales A.J., Needham L.L., Pirkle J.L. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113: 192-200.
155. Kim S., Lan Q., Waidyanatha S., et al. Genetic polymorphisms and benzene metabolism in humans exposed to a wide range of air concentrations. *Pharmacogenetics and Genomics.* 2007; 17: 789-801.

## 8 TABELLE E FIGURE

**Tabella 1:** Caratteristiche demografiche di casi (MP=malattia di Parkinson) e controlli.

<b>Variabili</b>		<b>MP</b> <b>(n=767)</b>	<b>Controlli</b> <b>(n=1989)</b>
<b>Età</b>	Mean (SD)	69.8 (9.2)	69.8 (10.0)
<b>Genere</b>	Maschi	426 (56%)	1057(53%)
	Femmine	341 (44%)	932 (47%)
<b>Aver mai fumato</b>	Sì	306 (40%) <sup>***</sup>	1067 (54%)
	No	460 (60%)	922 (46%)
	Non noto	1	0
<b>Pacchi-anno</b>	Media (DS)	10.0 (21.7)	17.1 (27.8) <sup>***</sup>
	<b>Non fumatori</b>	460	922
	<sup>1</sup> <b>Fumatori leggeri</b>	179	474
	<sup>2</sup> <b>Forti fumatori</b>	114	534 <sup>†††</sup>

<sup>\*\*\*</sup> $p < 0.0001$ , test  $U$  di Mann-Whitney; <sup>†††</sup> $p < 0.0001$ , test chi-quadro per trend, <sup>††††</sup> $p < 0.0001$ , test chi-quadro.

<sup>1</sup>Consumatori fino a 23.25 pacchi-anno; <sup>2</sup>consumatori di più di 23.25 pacchi-anno.

**Tabella 2.** Stime di rischio come *odds ratios* (OR) ed intervalli di confidenza al 95% (95% IC) delle interazioni gene-tabacco.

<b>Polimorfismi genetici</b>	<b>Genotipi candidati</b>	<b>O.R. (95% IC)<sup>¶</sup></b>
<i>CYP1B1</i> Leu432Val	Leu / Leu	1.25 (0.86 - 1.81)
<i>CYP2D6</i> G <sub>1846</sub> A	G / G	1.08 (0.74 - 1.57)
<i>GSTM1</i> Pos/Null	Pos	0.67 (0.47 - 0.95) <sup>*</sup>
<i>GSTM3</i> intron 6	* A * B / * B * B	0.85 (0.58 - 1.25)
<i>GSTP1</i> Ile105Val	Ile <sup>105</sup> / Ile <sup>105</sup>	1.26 (0.89 - 1.80)
<i>GSTP1</i> Ala114Val	Ala <sup>114</sup> / Ala <sup>114</sup>	1.35 (0.79 - 2.31)
<i>GSTP1</i> haplotype	* B * C	0.27 (0.08 - 0.93) <sup>*</sup>
<i>GSTT1</i> pos / null	Pos	1.43 (0.88 - 2.31)
<i>DAT1</i> A <sub>1342</sub> G	AA & AG	0.53 (0.27 - 1.04)
<i>NAT2</i> Fast / Slow	Fast	0.61 (0.43 - 0.87) <sup>*</sup>
<i>SOD2</i> Val16Ala	Val / Val	0.92 (0.61 - 1.37)
<i>EPHX1</i> Tyr113His <sup>#</sup>	Tyr / Tyr	1.49 (0.93 - 2.39)
<i>EPHX1</i> His139Arg	His / His	1.28 (0.88 - 1.85)
<i>NQO1</i> Pro187Ser	Pro / Pro	0.90 (0.63 - 1.30)
<i>DRD2</i> Taq IA <sup>§</sup>	1 / 2	0.93 (0.58 - 1.48)
<i>DRD2</i> Taq 1B <sup>†</sup>	1 / 2	0.90 (0.57 - 1.40)
<i>MAOA</i> T <sub>941</sub> G (males)	T	0.80 (0.47 - 1.37)
<i>MAOA</i> T <sub>941</sub> G (females)	TT & TG	0.57 (0.22 - 1.49)
<i>MAOB</i> A <sub>644</sub> G (males)	G	0.64 (0.39 - 1.03)
<i>MAOB</i> A <sub>644</sub> G (females)	AG/GG	1.10 (0.58 - 2.09)

<sup>¶</sup>Covariate nel modello: età, genere, traumi cranici con perdita di coscienza, familiarità di 1° grado positiva per MP. Le analisi comprendenti *MAOA* e *MAOB* sono state condotte separatamente per i due sessi.

<sup>\*</sup>  $p < 0.05$ ; <sup>#</sup> soggetti da Svezia e Italia esclusi dalle analisi; <sup>§</sup> soggetti da Svezia e Malta esclusi dalle analisi; <sup>†</sup> soggetti da Malta esclusi dalle analisi

**Tabella 3.** Stime del rischio come *odds ratios* (OR) ed intervalli di confidenza al 95% (95% IC) calcolate stratificando casi (MP) e controlli in tabelle 2X4 per fumo e genotipi.

Fumo	Genotipi	MP	Controlli	O.R. (95% CI) <sup>¶</sup>
<b><i>GSTM1</i></b>				
No	<i>Null</i>	233	466	1 (Rif.)
No	<i>Pos</i>	213	418	1.01 (0.80 - 1.28)
Sì	<i>Null</i>	172	507	0.65 (0.51 - 0.83) <sup>***</sup>
Sì	<i>Pos</i>	124	532	0.44 (0.34 - 0.57) <sup>***</sup>
<b><i>GSTP1</i></b>				
No	* <i>A</i> * <i>A</i>	204	434	1 (Rif.)
No	* <i>B</i> * <i>C</i>	18	26	1.38 (0.73 - 2.63)
Sì	<i>A</i> * <i>A</i>	161	519	0.61 (0.47 - 0.78) <sup>***</sup>
Sì	* <i>B</i> * <i>C</i>	4	37	0.23 (0.08 - 0.66) <sup>*</sup>
<b><i>NAT2</i></b>				
No	<i>Lento</i>	220	484	1 (Rif.)
No	<i>Rapido</i>	222	389	1.29 (1.02 - 1.63) <sup>*</sup>
Sì	<i>Lento</i>	179	564	0.67 (0.53 - 0.85) <sup>**</sup>
Sì	<i>Rapido</i>	112	463	0.52 (0.40 - 0.68) <sup>***</sup>

<sup>¶</sup>Covariate nel modello: età, genere, nazione, traumi cranici con perdita di coscienza, familiarità di 1° grado positiva per MP.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.005$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ .

**Tabella 4.** Stime del rischio come *odds ratios* (OR) ed intervalli di confidenza al 95% (95% IC) calcolate stratificando casi (MP) e controlli per livelli di pacchi-anno consumati e genotipi *GSTM1* e *NAT2*.

Fumo di sigaretta	Genotipi	MP	Controlli	O.R. (95% CI) <sup>¶</sup>
<i>GSTM1</i>				
Non fumatori	<i>Pos &amp; Null</i>	460	922	1 (Rif.)
<sup>1</sup> Fumatori leggeri	<i>Null</i>	95	215	0.76 (0.58 – 1.01)
<sup>1</sup> Fumatori leggeri	<i>Pos</i>	78	247	0.55 (0.42 – 0.74)***
<sup>2</sup> Forti fumatori	<i>Null</i>	68	260	0.44 (0.33 - 0.60)***
<sup>2</sup> Forti fumatori	<i>Pos</i>	42	259	0.26 (0.18 - 0.38)***
<i>NAT2</i>				
Non fumatori	<i>Rapidi &amp; Lenti</i>	460	922	1 (Rif.)
<sup>1</sup> Fumatori leggeri	<i>Slow</i>	100	257	0.67 (0.51 – 0.88)**
<sup>1</sup> Fumatori leggeri	<i>Fast</i>	71	198	0.64 (0.47 – 0.86)**
<sup>2</sup> Forti fumatori	<i>Slow</i>	71	277	0.42 (0.31 – 0.57)***
<sup>2</sup> Forti fumatori	<i>Fast</i>	36	237	0.26 (0.18 – 0.38)***

<sup>¶</sup>Covariate nel modello: età, genere, traumi cranici con perdita di coscienza, familiarità di 1° grado positiva per MP.

<sup>1</sup>Consumatori fino a 23.25 pacchi-anno; <sup>2</sup>consumatori di più di 23.25 pacchi-anno.

\*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ .

**Tabella 5.** Sintesi degli studi retrospettivi sulle interazioni gene (*GSTM1* e *GSTP1*)-tabacco nella malattia di Parkinson.

Genotipi/aplotipi candidati	Disegno degli studi <sup>§</sup>	Dimensioni del campione	Gruppi di riferimento		OR (95% IC)	Citazioni
			Fumo	Genotipi		
<b><i>GSTM1</i></b>						
<i>Pos</i>	C - C	100 vs 200	No	<i>GSTM1pos</i>	0.29 (0.14 - 0.59)	(7)
<i>Null</i>	Solo casi	396	Sì	<i>GSTM1pos</i>	0.87 (0.57 - 1.33)	(8)
<i>Pos</i>	C - C	235 vs 220	No	<i>GSTM1pos</i>	0.72 (0.43 - 1.21)	(9)
<b><i>GSTP1</i></b>						
<i>Ile105Val &amp; Val105Val</i>	Solo casi	396	Sì	<i>Ile105Ile</i>	0.92 (0.60 - 1.41)	(8)
			Sì	<i>Ala114Ala</i>	1.57 (0.85 - 2.92)	(8)
<i>Ala114Val &amp; Val114Val</i>	Solo casi	396	No	<i>Ala114Ala</i>	1.04 (0.42 - 2.59) per >0 - 10 pacchi-anno 1.74 (0.74 - 4.04) per >10 - 30 pacchi-anno 2.13 (0.86 - 5.23) per >30 pacchi-anno Chi-quadro per trend: p=0.02	(8)
	*C	Solo casi		Non presentato	2.00 (1.11 - 3.60)	(8)
<i>Val105Val</i>	C - C	214 vs 327	Yes	<i>Ile105Ile</i>	0.69 (0.30 - 1.60)	(10)

<sup>§</sup>C-C: caso-controllo

**Tabella 6.** Caratteristiche demografiche dei gruppi in studio.

	Vigili	Benzinai	Taxisti
N°	100	102	37
Età (anni, media $\pm$ DS)	41.4 $\pm$ 10.2	41.1 $\pm$ 13.4	42.7 $\pm$ 11.7
Genere (maschio/femmina)	66/34	69/33	35/2
Fumatori (Sì/no) (%)	20/80 (20%)	37/65 (36%)	15/22 (40%)
Sigarette/die (media $\pm$ DS)	6.5 $\pm$ 5.1	8.8 $\pm$ 6.7	13.6 $\pm$ 8.5
Turno, ore (media $\pm$ DS)	5.98 $\pm$ 0.24	9.79 $\pm$ 2.01	11.12 $\pm$ 1.71

**Tabella 7.** Distribuzione degli indicatori di esposizione e di ossidazione alla guanina nei lavoratori classificati per abitudine tabagica (F = fumatori; NF = non fumatori), valori espressi come medie [deviazioni standard] geometriche, in µg/g creatinina.

Indicatori	Vigili		Benzinai		Taxisti		$p^a$	
	NF (n = 80)	F (n = 20)	NF (n = 65)	F (n = 37)	NF (n = 22)	F (n = 15)	NF	F
<i>t,t</i> -MA	44.1 [1.73]	120 [1.58]**	46.8 [1.85]	76.5 [2.66]*	104 [1.77]	145 [1.61]	<0.0001	0.020
<i>S</i> -PMA	0.50 [2.67]	1.32 [2.17]**	0.77 [2.32]	1.35 [2.02]*	2.18 [1.85]	3.82 [1.53]*	<0.0001	<0.0001
8-oxodGuo	3.46 [1.50]	3.16 [1.55]	4.28 [1.42]	5.10 [1.42] <sup>#</sup>	4.43 [1.49]	5.68 [1.73]	0.002	<0.0001
8-oxoGuo	4.27 [1.48]	5.08 [1.46]	4.89 [1.54]	5.65 [1.58]	6.64 [1.48]	8.99 [1.40] <sup>#</sup>	<0.0001	<0.0001
8-oxoGua	33.1 [1.94]	67.8 [2.02]**	43.7 [2.23]	49.4 [1.90]	33.5 [1.74]	60.4 [2.05] <sup>#</sup>	0.055	0.247

\*\*  $p < 0.0001$ , \*  $p < 0.005$ , <sup>#</sup>  $p < 0.05$ , NF vs. F, test *t* di Student per campioni indipendenti; <sup>a</sup> ANOVA ad una via

**Tabella 8.** Coefficienti di correlazione di Pearson tra indicatori urinari nei soggetti non fumatori ( $n = 167$ ) e fumatori ( $n = 67$ ).

	Log <i>t,t</i> -MA	Cotina	Log 8-oxodGuo	Log 8-oxoGuo	Log 8-oxoGua	Creatinina
<i>Non-Fumatori</i> (n=167)						
Log <i>S</i> -PMA	0.430**	0.062	0.362**	0.434**	0.229**	0.357**
Log <i>t,t</i> -MA		0.088	0.462**	0.581**	0.293**	0.543**
Cotina			0.085	0.100	0.051	0.076
Log 8-oxodGuo				0.750**	0.384**	0.745**
Log 8-oxoGuo					0.472**	0.727**
Log 8-oxoGua						0.338**
<i>Fumatori</i> (n=67)						
Log <i>S</i> -PMA	0.474**	0.330**	0.377*	0.467**	0.134	0.280*
Log <i>t,t</i> -MA		0.354**	0.220	0.296*	0.109	0.290*
Log Cotina			0.191	0.213	-0.020	0.111
Log 8-oxodGuo				0.559**	0.061	0.587**
Log 8-oxoGuo					0.366**	0.572**
Log 8-oxoGua						0.250*

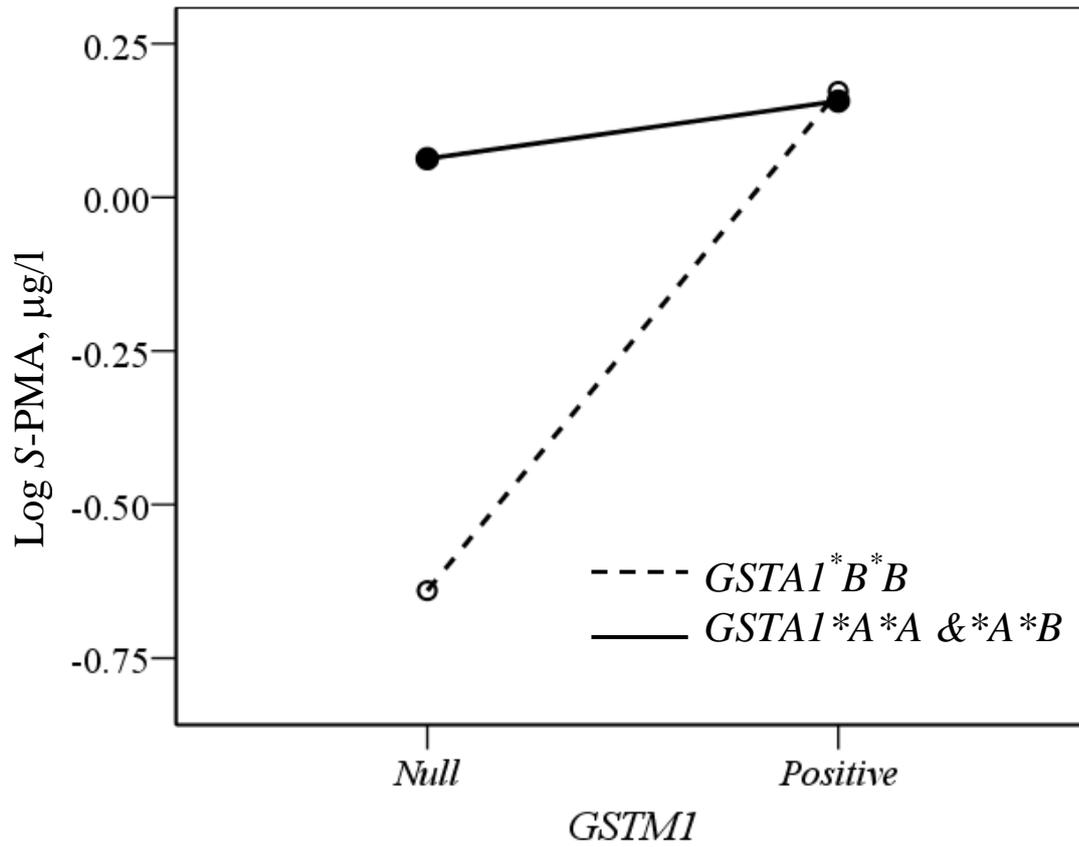
\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$

**Tabella 9.** Parametri dei modelli di regressione lineare multipla con gli indicatori di ossidazione alla guanina come variabili dipendenti, descritti dall'equazione:  $\text{Log}(\text{indicatore}) = \text{costante} + (\text{creatinina})\beta_1 + \text{Log}(S\text{-PMA}/t,t\text{-MA})\beta_2 + (\text{fumo})\beta_3 + (\text{Età})\beta_4 + (\text{genotipo } NQOI)\beta_5$ . Sono dati i valori delle costanti e dei coefficienti  $\beta$ , gli  $r^2$  parziali ( $r^2_p$ ) e le significatività ( $p$ ); gli  $r^2$  aggiustati ( $r^2_{\text{agg.}}$ ) e le significatività dei modelli ( $p$ ) nelle ultime righe.

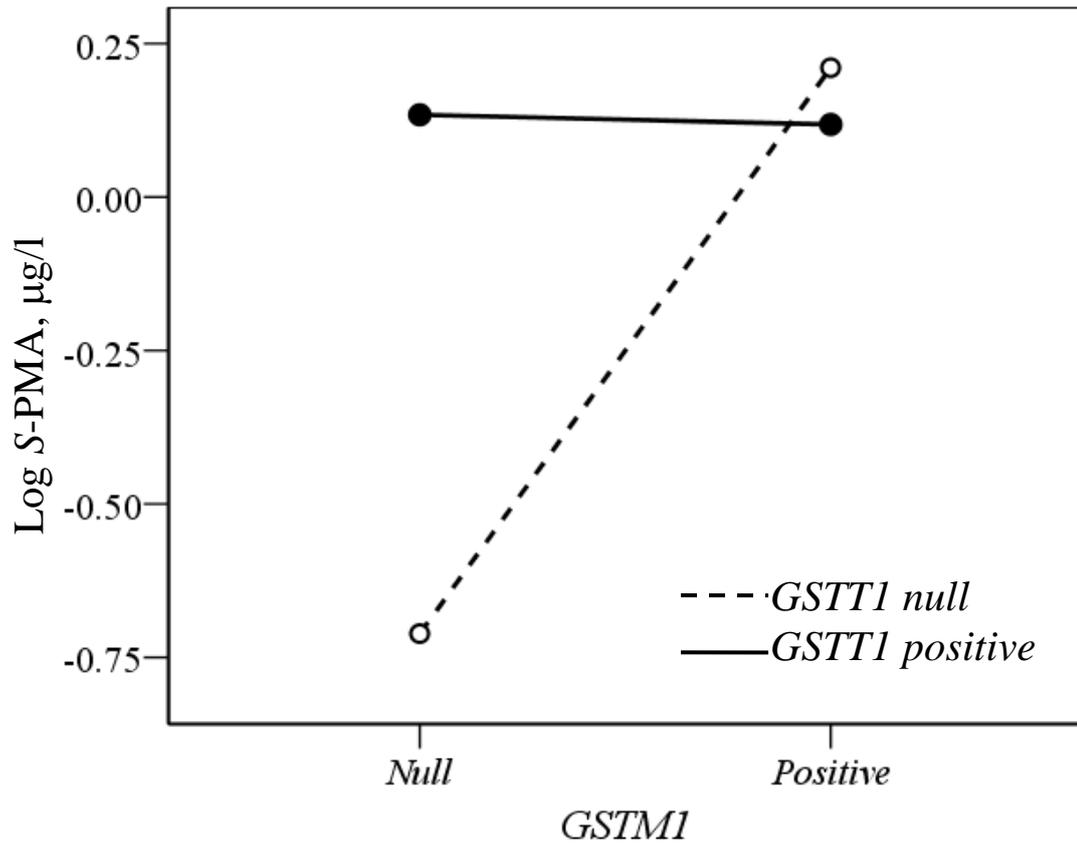
	8-oxodGuo			8-oxoGuo			8-oxoGua		
	$\beta \pm \text{ES}$ [ $\beta_{\text{stand}}$ ]	$r^2_p$	$p$	$\beta \pm \text{ES}$ [ $\beta_{\text{stand}}$ ]	$r^2_p$	$p$	$\beta \pm \text{ES}$ [ $\beta_{\text{stand}}$ ]	$r^2_p$	$p$
Costanti	0.30±0.03	-	<0.0001	0.09±0.09	-	n.s.	1.44±0.05	-	<0.0001
Creatinina	0.27±0.02 [0.66]	0.487	<0.0001	0.25±0.03 [0.58]	0.426	<0.0001	0.16±0.03 [0.31]	0.089	<0.0001
Log S-PMA	0.09±0.03 [0.15]	0.034	0.003	0.21±0.04 [0.30]	0.097	<0.0001	-	-	n.s.
Fumo	0.06±0.03 [0.10]	0.009	0.043	-	-	n.s.	0.20±0.04 [0.29]	0.082	<0.0001
Età	-	-	n.s.	0.006±0.001 [0.27]	0.059	<0.0001	-	-	n.s.
<i>NQOI</i>	-	-	n.s.	0.07±0.04 [0.12]	0.014	0.041	-	-	n.s.
$r^2$ del modello, $p$		0.524	<0.0001		0.583	<0.0001		0.164	<0.0001
Costanti	0.27±0.03	-	<0.0001	-0.31±0.12	-	0.012	1.44±0.05	-	<0.0001
Creatinina	0.29±0.02 [0.70]	0.487	<0.0001	0.25±0.03 [0.59]	0.426	<0.0001	0.15±0.03 [0.31]	0.089	<0.0001
Log <i>t,t</i> -MA	-	-	n.s.	0.21±0.05 [0.27]	0.060	<0.0001	-	-	n.s.
Fumo	0.10±0.03 [0.16]	0.026	0.001	-	-	n.s.	0.20±0.04 [0.29]	0.083	<0.0001
Età	-	-	n.s.	0.007±0.001 [0.30]	0.076	<0.0001	-	-	n.s.
<i>NQOI</i>	-	-	n.s.	0.08±0.04 [0.13]	0.016	0.008	-	-	n.s.
$r^2$ del modello, $p$		0.508	<0.0001		0.565	<0.0001		0.165	<0.0001

Legenda: 8-oxodGuo, 8-idrossi-7,8-diidro-2'-deossiguanosina; 8-oxoGuo, 8-idrossi-7,8-diidroguanosina; 8-oxoGua, 8-idrossi-7,8-diidroguanina; S-PMA, acido S-fenilmercapturico; *t,t*-MA, acido *trans,trans*-muconico; n.s. non significativo.

**Figura 1.** Medie marginali dei livelli log-trasformati di S-PMA nei campioni di fine turno, in funzione dei polimorfismi genetici *GSTM1* e *GSTAI* (A), e *GSTM1* e *GSTT1* (B).



**Figura 2.** Medie marginali dei livelli di S-PMA (log-trasformati) nei campioni di fine turno, in funzione dei polimorfismi genetici *GSTM1* e *GSTT1* (B).



## **9 ALLEGATI**

- A. Elenco dei lavori scientifici pubblicati sull'argomento oggetto dalla tesi;
- B. Copie dei lavori scientifici, riportati nel suddetto elenco in carattere grassetto.

A. Elenco dei lavori scientifici pubblicati sull'argomento oggetto dalla tesi:

1. **Case-control study of interactions between genetic and environmental factors in Parkinson's disease.** De Palma G, Mozzoni P, Mutti A, Calzetti S, Negrotti A. *Lancet* 1998; 352 (9145): 1986-7.
2. Biomarkers of dose and susceptibility in cyclists exposed to monoaromatic hydrocarbons. Bergamaschi E, Brustolin A, De Palma G, Manini P, Mozzoni P, Andreoli R, Cavazzini S, Mutti A. *Toxicol Lett* 1999; 108: 241-247.
3. I polimorfismi metabolici come caratteri complessi: implicazioni per il monitoraggio biologico e la valutazione del rischio. De Palma G, Mutti A. *Folia Med* 2000; 71 (S2): 7-21.
4. **Polyimorphism of quinone-metabolizing enzymes and susceptibility to ozone-induced acute effects.** Bergamaschi E, De Palma G, Mozzoni P, Vanni S, Vettori MV, Broeckaert F, Bernard A, Mutti A. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163, 1426-1431.
5. **Polymorphism of xenobiotic-metabolizing enzymes and excretion of styrene-specific mercapturic acids.** De Palma G, Manini P, Mozzoni P, Bergamaschi E, Cavazzini S, Franchini I., Mutti A. *Chem Res Toxicol* 2001; 14 (10), 1393-1400.
6. GSTM1 polymorphism and styrene metabolism: insights from an acute accidental exposure. Manini P, De Palma G, Mozzoni P, Andreoli R, Poli D, Bergamaschi E, Franchini I, Mutti A. *Toxicol Lett* 2002;134(1-3):201-8.

7. Effetti renali di basse dosi di mercurio. Alinovi R, Buzio L, Mozzoni P, De Palma G, Carta P, Flore C, Colombi A, Russo A, Soleo L, Mutti A. *Med Lav* 2002; 93(3): 191-201.
8. **Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and styrene-induced DNA damage.** Buschini A, De Palma G, Poli P, Martino A, Rossi C, Mozzoni P, Scotti E, Buzio L, Bergamaschi E, Mutti A. *Environ Mol Mutagen* 2003;41(4):243-52.
9. Acute renal and hepatic failure due to accidental percutaneous absorption of 1,2-dichloropropane contained in a commercial paint fixative. Fiaccadori E, Maggiore U, Rotelli C, Giacosa R, Ardissino D, De Palma G, Bergamaschi E, Mutti A. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 (1): 219-20.
10. **Glutathione S-transferases M1-1 and T1-1 as risk modifiers for renal cell cancer associated with occupational exposure to chemicals.** Luca Buzio, Giuseppe De Palma, Paola Mozzoni, Martin Tondel, Carlo Buzio, Innocente Franchini, Olav Axelson, Antonio Mutti. *Occup Environ Med* 2003; 60: 789-793
11. **Characterization of GSTM3 polymorphism by Real-Time PCR with LightCycler.** Mozzoni P, De Palma G, Scotti E, Capelletti M, Mutti A. *Anal Biochem* 2004; 330 (1): 175-7.
12. Polimorfismo ALAD ed indicatori di dose e di effetto dell'esposizione professionale a piombo inorganico. G. De Palma, E. Scotti, P. Mozzoni, R. Alinovi, P. Apostoli, G. Neri, L. Soleo, F. Cassano, P. Carta, N. Murgia, G. Muzi, A. Mutti. *G Ital Med Lav Ergon.* 2005; 27 (Suppl 1): 39-42.
13. **Environmental and biological monitoring of benzene exposure in a cohort of Italian taxi drivers.** Manini P, De Palma G, Andreoli R, Poli D, Mozzoni P, Folesani G, Mutti A, Apostoli P. *Toxicol Lett.* 2006; 167(2): 142-51.

14. **Cytogenetic biomarkers, urinary metabolites and metabolic gene polymorphisms in workers exposed to styrene.** Migliore L, Naccarati A, Coppede F, Bergamaschi E, De Palma G, Voho A, Manini P, Jarventaus H, Mutti A, Norppa H, Hirvonen A. *Pharmacogenet Genomics*. 2006; 16(2): 87-99.
15. **Association of DNA repair polymorphisms with DNA repair functional outcomes in healthy human subjects.** Vodicka P, Stetina R, Polakova V, Tulupova E, Naccarati A, Vodickova L, Kumar R, Hanova M, Pardini B, Slyskova J, Musak L, De Palma G, Soucek P, Hemminki K. *Carcinogenesis*. 2006; 8: 657-664.
16. **Gene-environment interactions in parkinsonism and Parkinson's disease: the Geoparkinson study.** Dick FD, De Palma G, Ahmadi A, Osborne A, Scott NW, Prescottt GJ, Bennett J, Semple S, Dick S, Mozzoni P, Haites N, Wettinger SB, Mutti A, Otelea M, Seaton A, Soderkvist P, Felice A; Geoparkinson Study Group. *Occup Environ Med*. 2007; 64(10): 673-80.
17. Epidermal growth factor receptor intron-1 polymorphism predicts gefitinib outcome in advanced non-small cell lung cancer. Tiseo M, Capelletti M, De Palma G, Franciosi V, Cavazzoni A, Mozzoni P, Alfieri RR, Goldoni M, Galetti M, Bortesi B, Bozzetti C, Loprevite M, Boni L, Camisa R, Rindi G, Petronini PG, Ardizzoni A. *J Thorac Oncol*. 2008; 3 (10): 1104-11.
18. Predictors of gefitinib outcomes in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Study of a comprehensive panel of molecular markers. Tiseo M, Rossi G, Capelletti M, Sartori G, Spiritelli E, Marchioni A, Bozzetti C, De Palma G, Lagrasta C, Campanini N, Camisa R, Boni L, Franciosi V, Rindi G, Ardizzoni A. *Lung Cancer*. 2010; 67 (3): 355-360.

19. **Biomarkers of nucleic acid oxidation, polymorphism in, and expression of, hOGG1 gene in styrene-exposed workers.** Manini P, De Palma G, Andreoli R, Marczyński B, Hanova M, Mozzoni P, Naccarati, A, Vodickova L, Hlavac P, Mutti A, Vodicka P. *Toxicol Lett.* 2009; 190(1): 41-7.
20. **A case-control study of Parkinson's disease and tobacco use: gene-tobacco interactions.** De Palma G, Dick FD, Calzetti S, Scott NW, Prescott GJ, Osborne A, Haites N, Mozzoni P, Negrotti A, Scaglioni A, Mutti A, on behalf of the Geoparkinson study group. *Mov Disorders* 2010; 25(7): 912-9
21. Functional characterization of gefitinib uptake in non-small cell lung cancer cell lines. Galetti M, Alfieri RR, Cavazzoni A, La Monica S, Bonelli M, Fumarola C, Mozzoni P, De Palma G, Andreoli R, Mutti A, Mor M, Tiseo M, Ardizzoni A, Petronini PG. *Biochem Pharmacol.* 2010; 80(2):179-87.
22. **Occupational exposure to low levels of benzene: Biomarkers of exposure and nucleic acid oxidation and their modulation by polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes.** Manini P, De Palma G, Andreoli R, Mozzoni P, Poli D, Goldoni M, Petyx M, Apostoli P, Mutti A. *Toxicol Lett.* 2010; 193: 229-35.

B. Copie dei lavori scientifici pubblicati sull'argomento oggetto dalla tesi.