

# La cancerogenesi chimica

# Introduzione

- Cancerogenesi: processo nel quale emergono neoformazioni tessutali atipiche indotte dall'azione di fattori oncogeni
- Tra l'azione dei cancerogeni e l'insorgenza di tumori esiste un tempo di latenza
- Le cellule cancerose non raggiungono lo stadio finale della differenziazione, ma si moltiplicano in modo incontrollato e indipendente dai meccanismi di regolazione
- Decisivo per lo sviluppo di un tumore è il rapporto tra la generazione dovuta a divisione cellulare e la perdita dovuta ad apoptosi
- Le cellule delle neoformazioni hanno una vita più lunga dei tessuti circostanti

- Coinvolgimento degli enzimi antiossidanti CAT e GPx in difesa contro la genotossicità di 2 pesticidi (danno al DNA, generazione di ROS)
- Il ruolo dello stress ossidativo nell'induzione *in vitro* dei micronuclei tramite pesticidi in fibroblasti polmonari di topo (*Mutagenesis*, **18**: 127-132; 2003)

# Le differenze tra tumori benigni e maligni

- Caratteristiche tumore: quadro istologico, velocità e autonomia di crescita, crescita invasiva, capacità di formare metastasi e loro entità
- Carcinoma: origina da epitelio
- Sarcoma, leucemie, linfoma: originano da mesotelio
- Benigni: si sviluppano come una massa cellulare compatta, comprimono il tessuto circostante senza danneggiarlo

- Maligni: crescono in modo aggressivo e si spingono negli spazi intercellulari del tessuto circostante (crescita invasiva).
- Le membrane basali delle cellule normali sono danneggiate dalle proteasi presenti in grande quantità nelle cellule tumorali maligne, che sono anche facilmente plasmabili: si spingono nelle fessure presenti e preparano la successiva penetrazione attraverso gli enzimi litici

- Metastasi: dal tumore primario si liberano cellule che si spingono nei vasi sanguigni o linfatici
- A causa dei difetti presenti nella membrana cellulare e nel citoscheletro le cellule tumorali sono molto flessibili  si spingono attraverso le pareti dei capillari nei nuovi tessuti
- Siti preferiti organi ben irrorati: fegato, polmoni
- Attraverso la linfa si insediano nei linfonodi

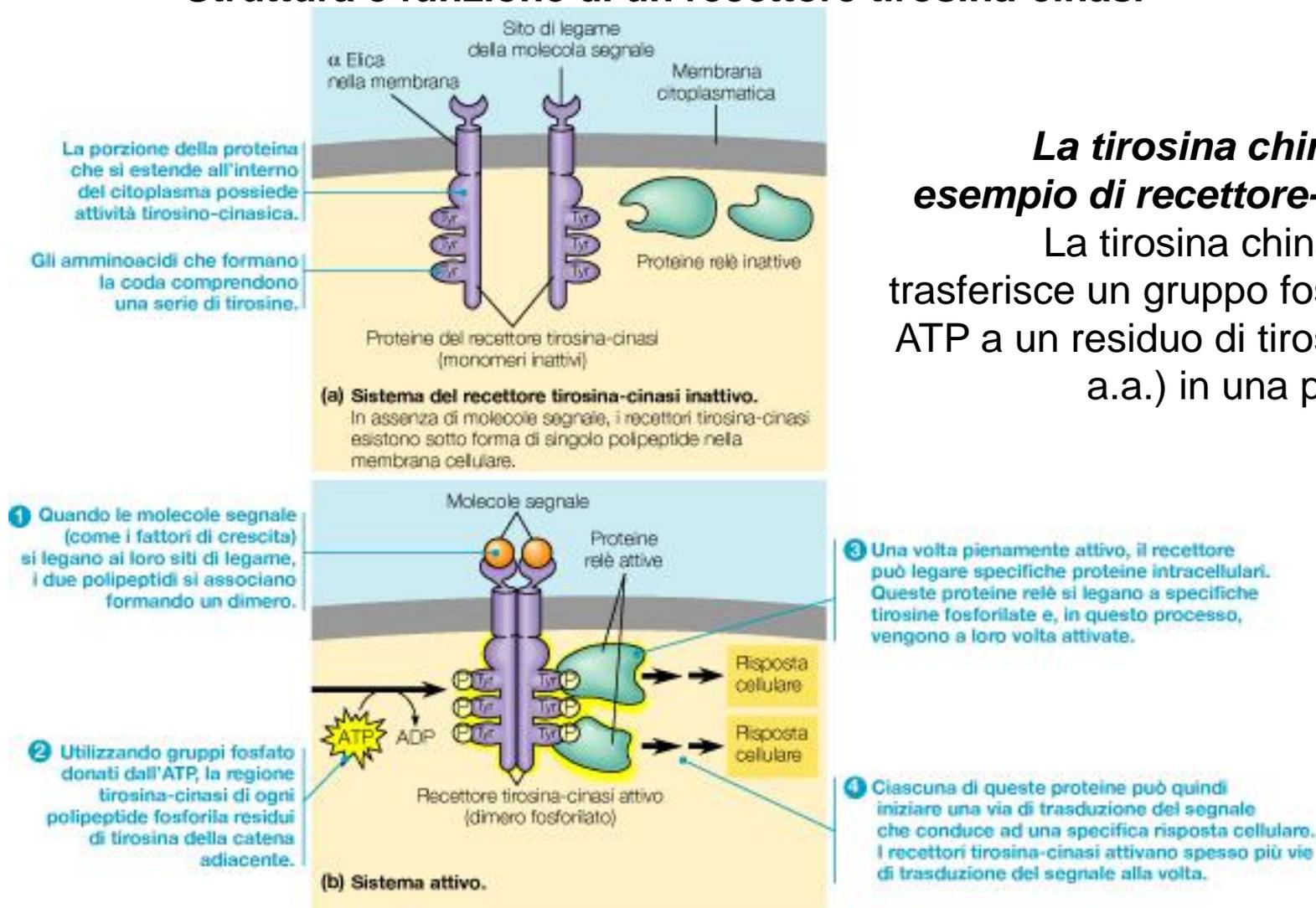
# Il controllo delle funzioni cellulari

- *All'aumentare della malignità le cellule tumorali diventano sempre più indipendenti dai fattori di controllo della crescita*
- *I proto-oncogeni possono aver subito una mutazione tale da esprimere recettori per i fattori di crescita*

# Il controllo della crescita

- Recettore **insulino-simile**: nel dominio extracellulare siti di legame specifici per molecole segnale come i fattori di crescita e gli ormoni; il dominio intracellulare agisce come tirosina cinasi
- Fattori di crescita dell'epidermide (EGF), derivati dalle piastrine (PDGF)
- Tirosina cinasi attivata e fosforilata a più residui tirosinici, alle quali si legano altre cinasi che agiscono come molecole segnale intracellulari

# Struttura e funzione di un recettore tirosina-cinasi



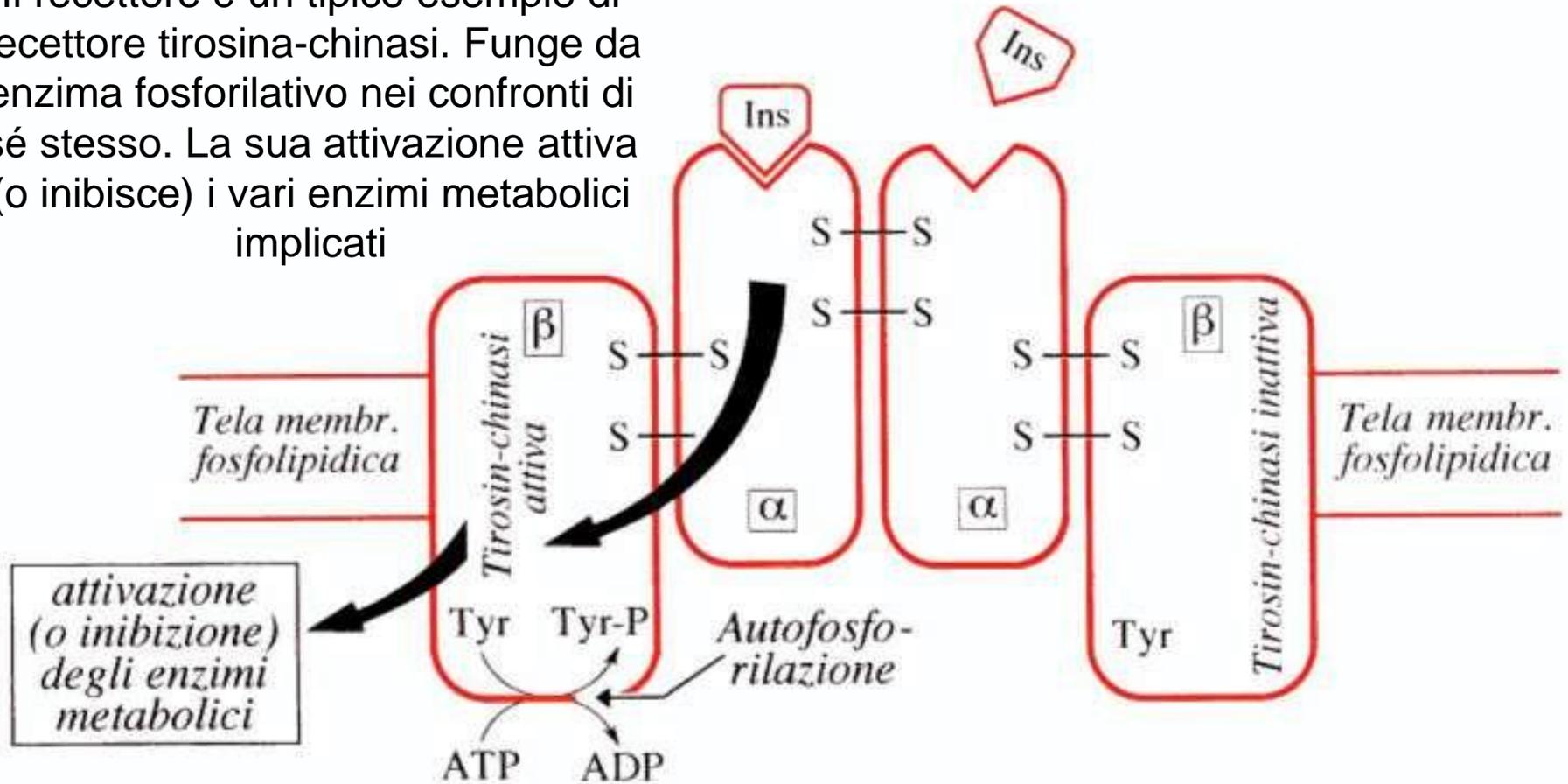
**La tirosina chinasi, un esempio di recettore-enzima**

La tirosina chinasi (TK) trasferisce un gruppo fosfato da ATP a un residuo di tirosina (un a.a.) in una proteina.

Il recettore di un fattore di crescita è spesso un recettore tirosina-cinasi, appartenente ad una delle principali classi di recettori di membrana che possiedono attività enzimatica. Una porzione del recettore situata sul lato citoplasmatico della membrana funziona come un enzima, chiamato **tirosina-cinasi**, che catalizza il trasferimento di gruppi fosfato dall'ATP all'aa tyr di una proteina substrato.

# Azione dell'insulina a livello cellulare

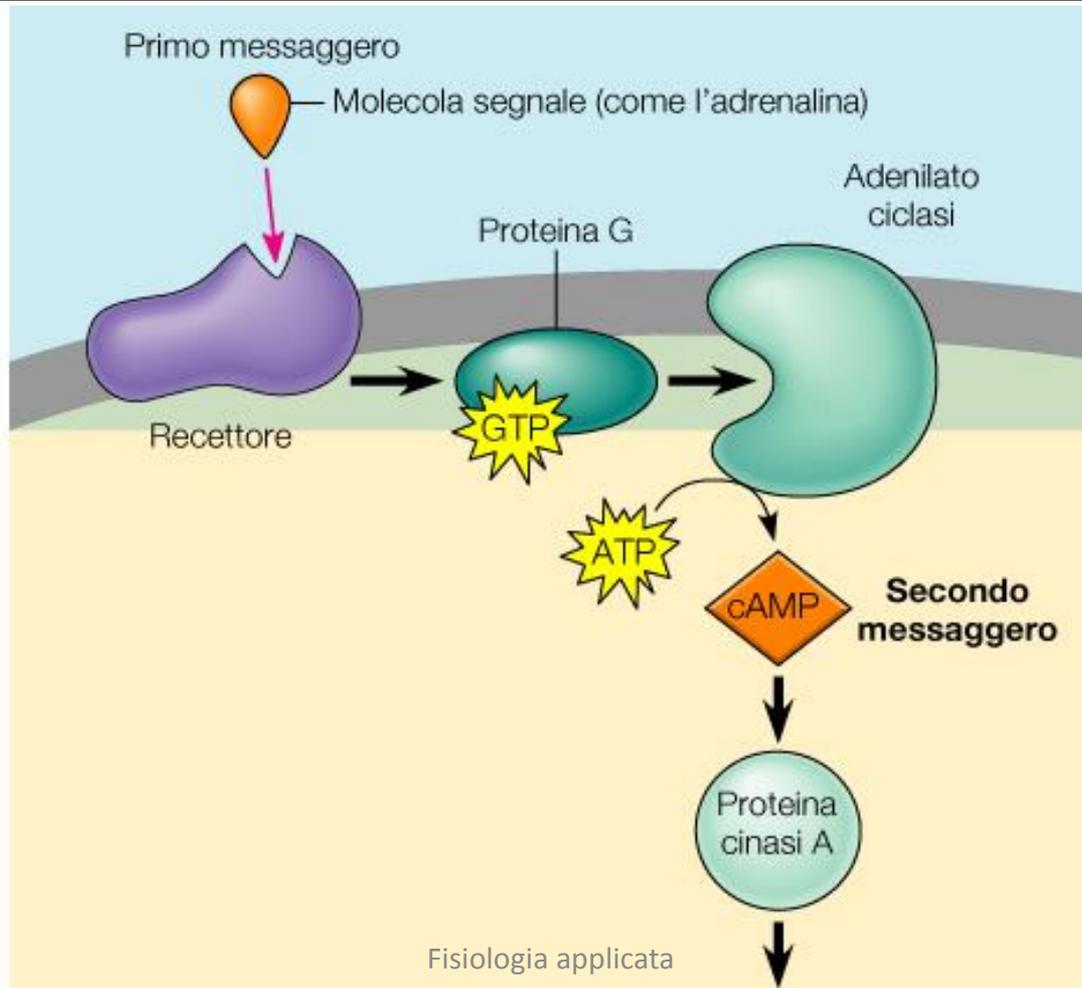
Il recettore è un tipico esempio di recettore tirosina-chinasi. Funge da enzima fosforilativo nei confronti di sé stesso. La sua attivazione attiva (o inibisce) i vari enzimi metabolici implicati



# Le molecole segnale per il controllo di processi biologici

- Legame molecola segnale recettore è reversibile
- I recettori sono disattivati per defosforilazione
- Es.: la subunità  $\alpha$  della proteina G agisce come fosfatasi, idrolizza la GTP legata a GDP, eliminando l'azione sull'adenilato ciclasi e termina la formazione di cAMP e si disattiva il sistema

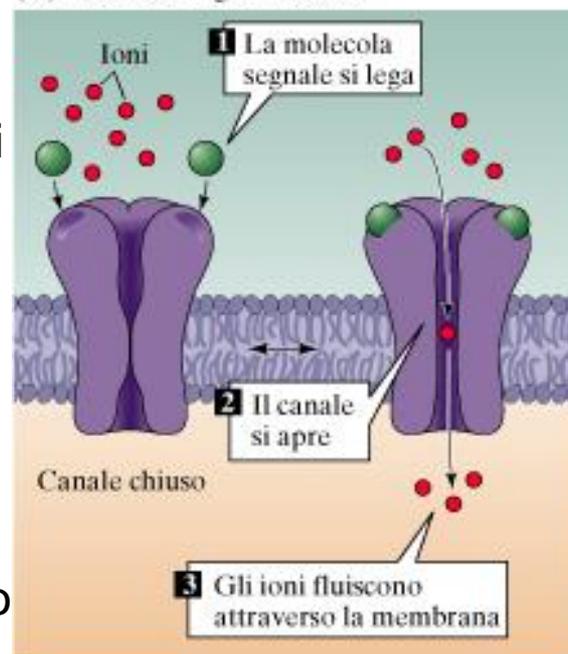
**Il cAMP come secondo messaggero.** È un componente di molte vie di segnalazione che coinvolgono le proteine G. La molecola segnale – “il primo messaggero” – attiva un recettore associato a proteine G, che attiva una proteina G. La proteina G attiva, a sua volta, l’adenilato ciclasi, che catalizza la conversione dell’ATP in cAMP. Questo attiva infine un’altra proteina, generalmente la proteina cinasi A.



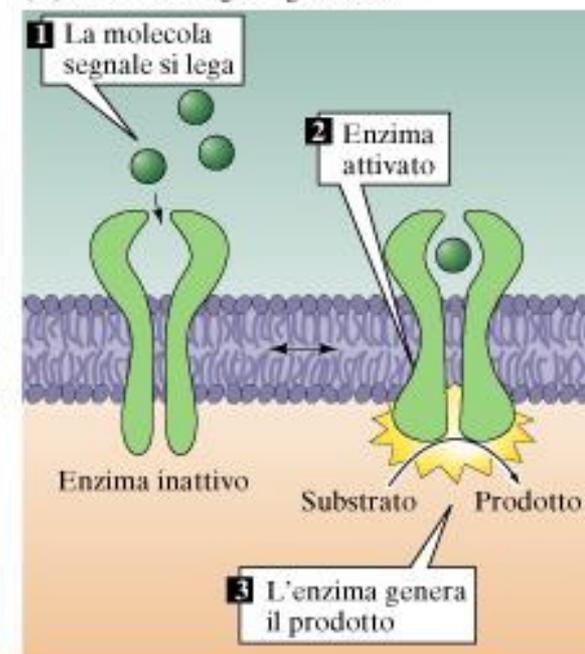
Categorie di recettori cellulari. Le molecole segnale non permeanti possono legare e attivare recettori legati ai canali ionici (A), recettori legati agli enzimi (B), o recettori accoppiati alle proteine G (C). Le molecole segnale permeanti attivano recettori intracellulari (D). I recettori delle molecole segnale non permeanti sono proteine transmembrana che comprendono porzioni sia all'interno sia all'esterno della superficie cellulare.

I recettori intracellulari sono attivati da permeanti o molecole segnale lipofile. Spesso questi recettori sono costituiti da una proteina recettrice legata a un complesso proteico inibitore. Quando la molecola segnale si lega al recettore, il complesso inibitore si dissocia per esporre un dominio di legame del DNA sul recettore.

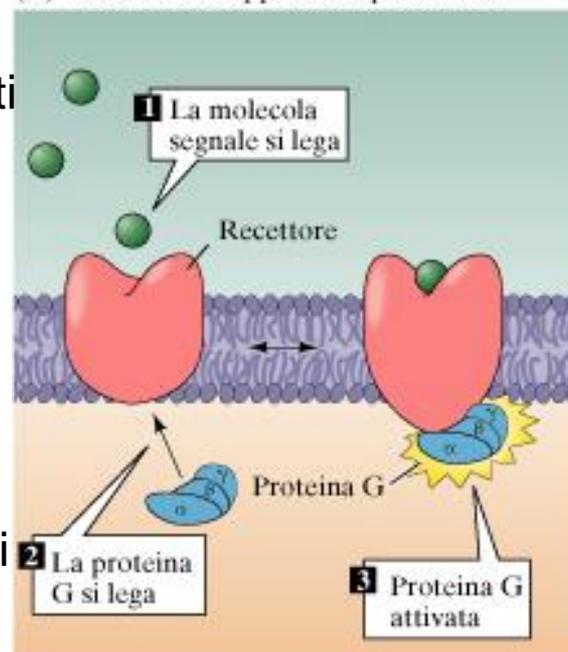
(A) Recettori legati ai canali



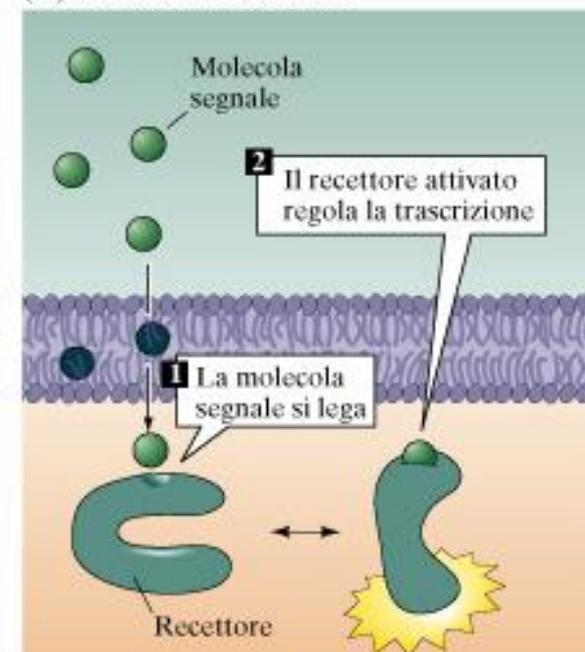
(B) Recettori legati agli enzimi



(C) Recettori accoppiati alle proteine G

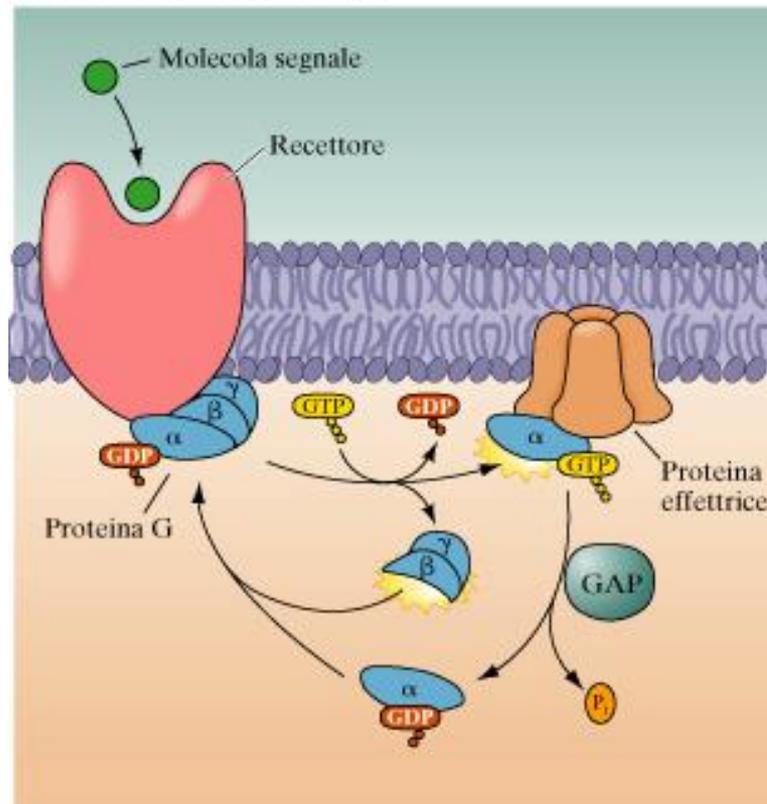


(D) Recettori intracellulari

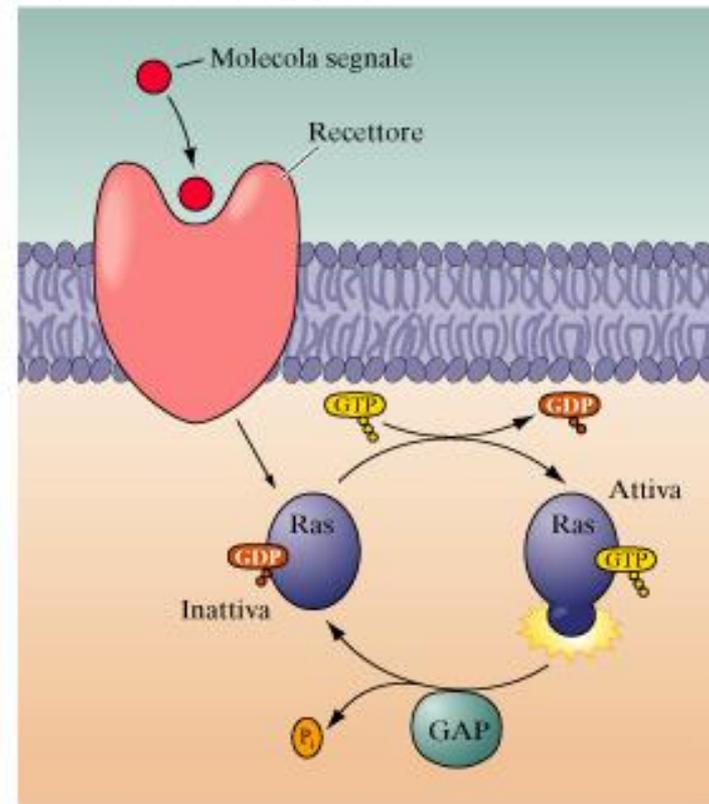


Tipi di proteine che legano il GTP. (A) Sono costituite da 3 distinte subunità ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ). L'attivazione del recettore promuove il legame della proteina G al recettore in modo che il GDP viene spiazzato e la subunità  $\alpha$  si lega al GTP, determinando la dissociazione della subunità  $\alpha$  dalle subunità  $\beta$  e  $\gamma$ .

(A) Proteine G eterotrimeriche

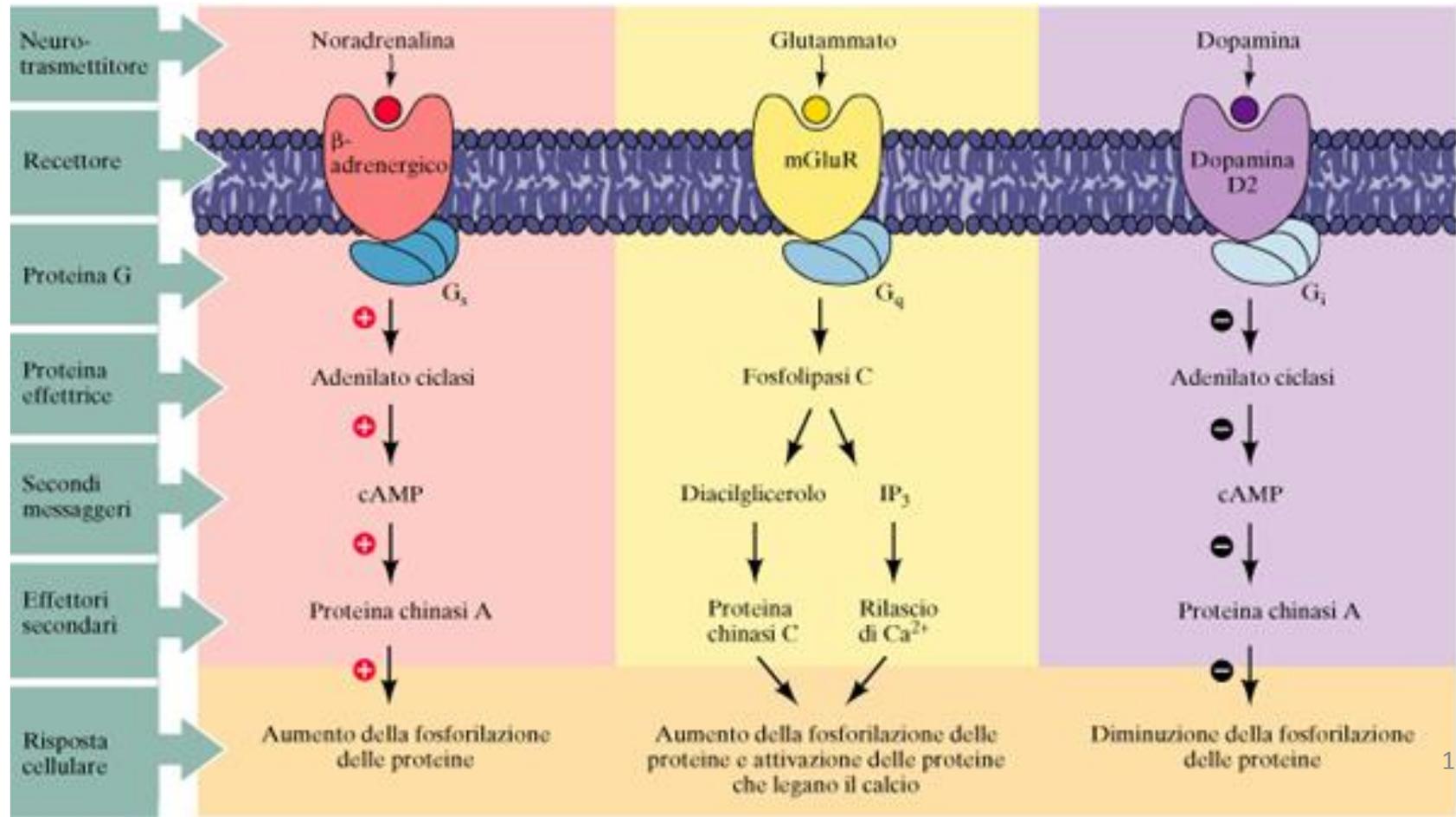


(B) Proteine G monomeriche



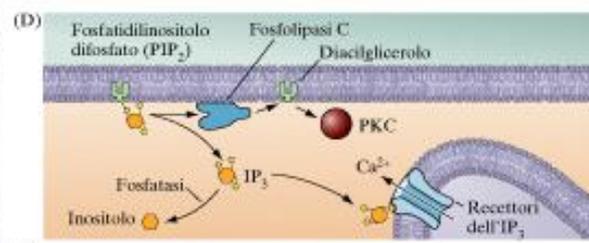
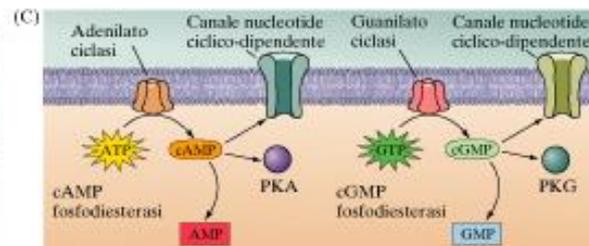
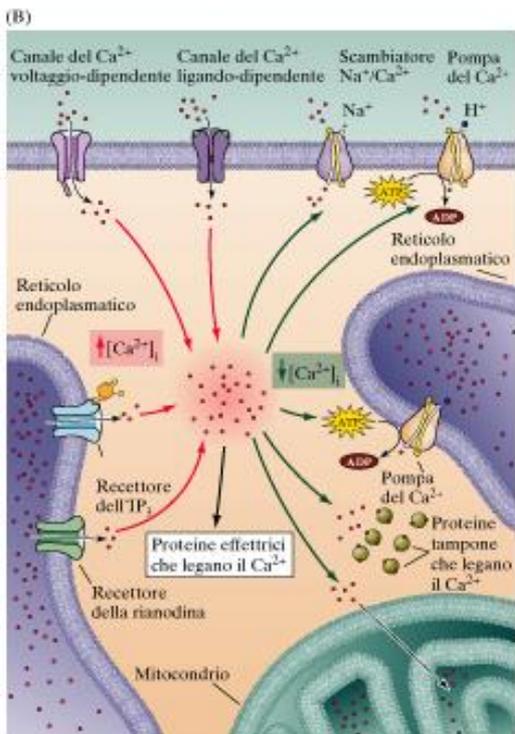
(B) Usano meccanismi simili per trasmettere segnali dai recettori di superficie della cellula attivata ai bersagli intracellulari. Il legame del GTP stimola le azioni biologiche di queste proteine G, e la loro attività viene terminata dall'idrolisi del GTP, che è anche regolata dalle proteine GAP.

Vie effettrici associate a recettori accoppiati a proteine G.  $G_s$ ,  $G_q$  e  $G_i$  si riferiscono ai 3 diversi tipi di proteine G eteromeriche. Come le molecole effettrici di attivazione, le proteine G si possono legare direttamente e inattivare i canali ionici. Per esempio, alcuni neuroni, come pure le cellule muscolari cardiache, hanno recettori accoppiati alle proteine G che legano acetilcolina. Poiché questi recettori sono attivati anche dall'agonista muscarina, di solito sono detti recettori muscarinici. La loro attivazione può causare l'apertura dei canali del  $K^+$ , determinando un rallentamento nella generazione dei potenziali d'azione.



Secondo messaggero	Sorgenti	Bersagli intracellulari	Meccanismi di rimozione
Ca <sup>2+</sup>	Membrana plasmatica: Canali del Ca <sup>2+</sup> voltaggio-dipendenti Vari canali ligando-dipendenti	Calmodulina Proteina chinasi Proteina fosfatasi Canali ionici Sinaptotagmina	Membrana plasmatica: Scambiatore Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> Pompa del Ca <sup>2+</sup> Reticolo endoplasmatico: Pompa del Ca <sup>2+</sup>
	Reticolo endoplasmatico: Receptor dell'IP <sub>3</sub> Receptor della rianodina	Molte altre proteine che legano il Ca <sup>2+</sup>	Mitocondri
AMP ciclico	L'adenilato ciclasi agisce sull'ATP	Proteina chinasi A Canali nucleotide ciclico-dipendenti	cAMP fosfodiesterasi
GMP ciclico	La guanilato ciclasi agisce sul GTP	Proteina chinasi G Canali nucleotide ciclico-dipendenti	cGMP fosfodiesterasi
IP <sub>3</sub>	La fosfolipasi C agisce sul PIP <sub>2</sub>	Receptor dell'IP <sub>3</sub> sul reticolo endoplasmatico	Fosfatasi
Diacilglicerolo	La fosfolipasi C agisce sul PIP <sub>2</sub>	Proteina chinasi C	Vari enzimi
Monossido di azoto	La monossido di azoto sintasi agisce sull'arginina	Guanilato ciclasi	Ossidazione spontanea

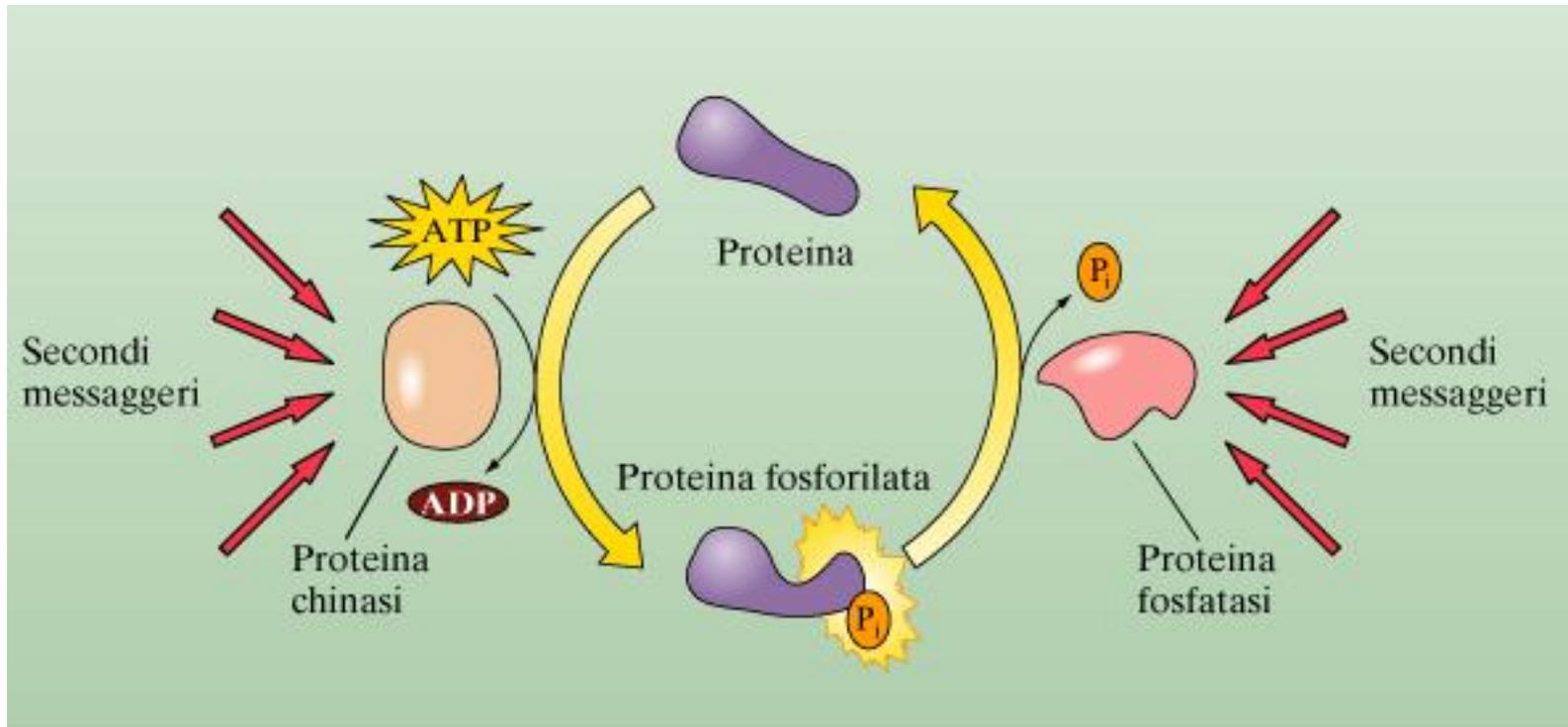
Secondi messaggeri neuronali. (A) Meccanismi responsabili della loro produzione e rimozione, e dei bersagli a valle di essi. (B) Proteine coinvolte nella liberazione e rimozione di Ca<sup>2+</sup> nel citoplasma e dal citoplasma. (C) Meccanismi di produzione e degradazione dei nucleotidi ciclici. (D) Vie metaboliche coinvolte nella produzione e nella rimozione di DAG e IP<sub>3</sub>. (E) Sintesi e degradazione del NO. I neuroni utilizzano molti tipi diversi di secondi messaggeri come molecole segnale intracellulari.



Questi messaggeri si differenziano per i meccanismi attraverso i quali sono prodotti e rimossi, come pure nei loro bersagli ed effetti a valle.

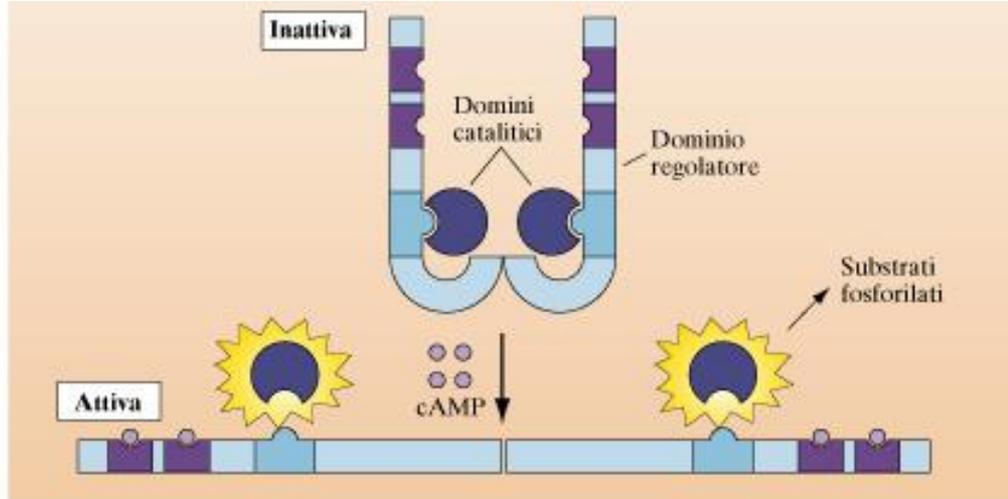
Il Ca<sup>2+</sup> è forse il + comune messaggero intracellulare dei neuroni. Sono poche le funzioni neuronali che non vengono influenzate, direttamente o indirettamente, da esso. Uno dei suoi bersagli + studiati è la calmodulina, 1 delle proteine che lo legano + abbondanti nel citoplasma di tutte le cellule.

Regolazione delle proteine cellulari mediata dalla fosforilazione. Le proteina chinasi trasferiscono gruppi fosfato dall'ATP ai residui di serina, treonina o tirosina su proteine substrato. Questa fosforilazione altera reversibilmente la struttura e la funzione delle proteine cellulari. Sia le chinasi sia le fosfatasi sono regolate da una serie di secondi messaggeri cellulari.

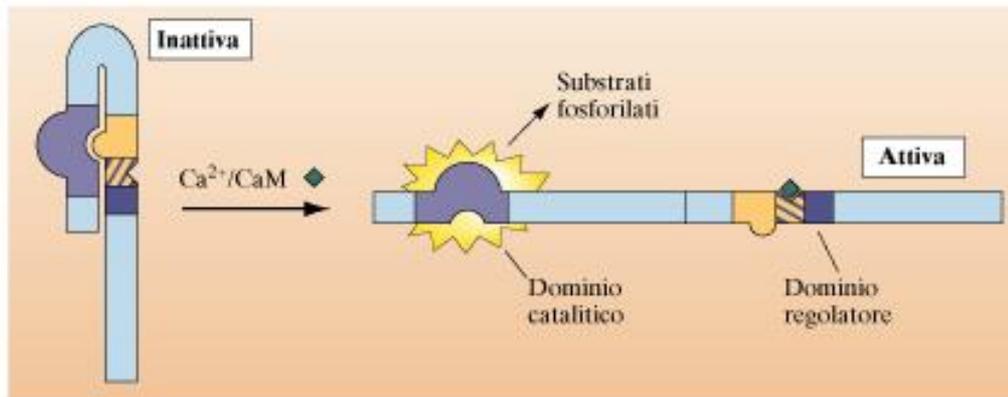


I secondi messaggeri regolano tipicamente la funzione neuronale modulando lo stato di fosforilazione delle proteine intracellulari. I substrati delle proteina chinasi e fosfatasi comprendono enzimi, recettori dei neurotrasmettitori, canali ionici e proteine strutturali.

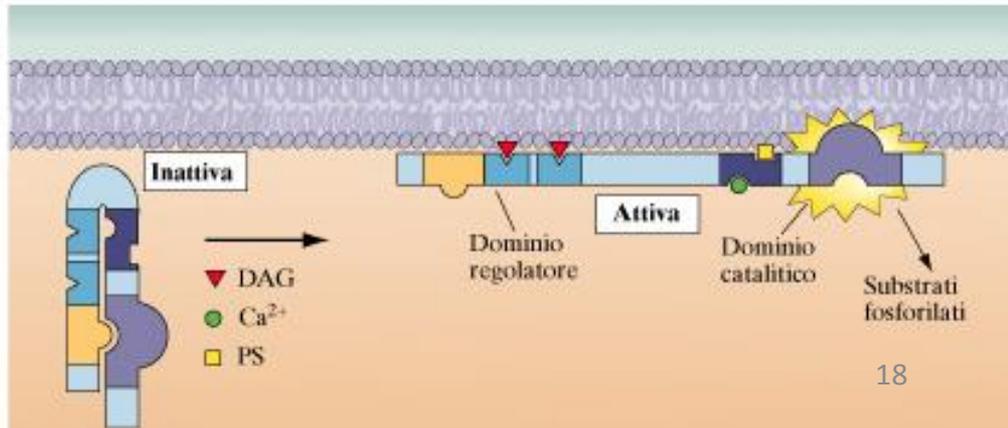
(A) PKA



(B) CaMKII

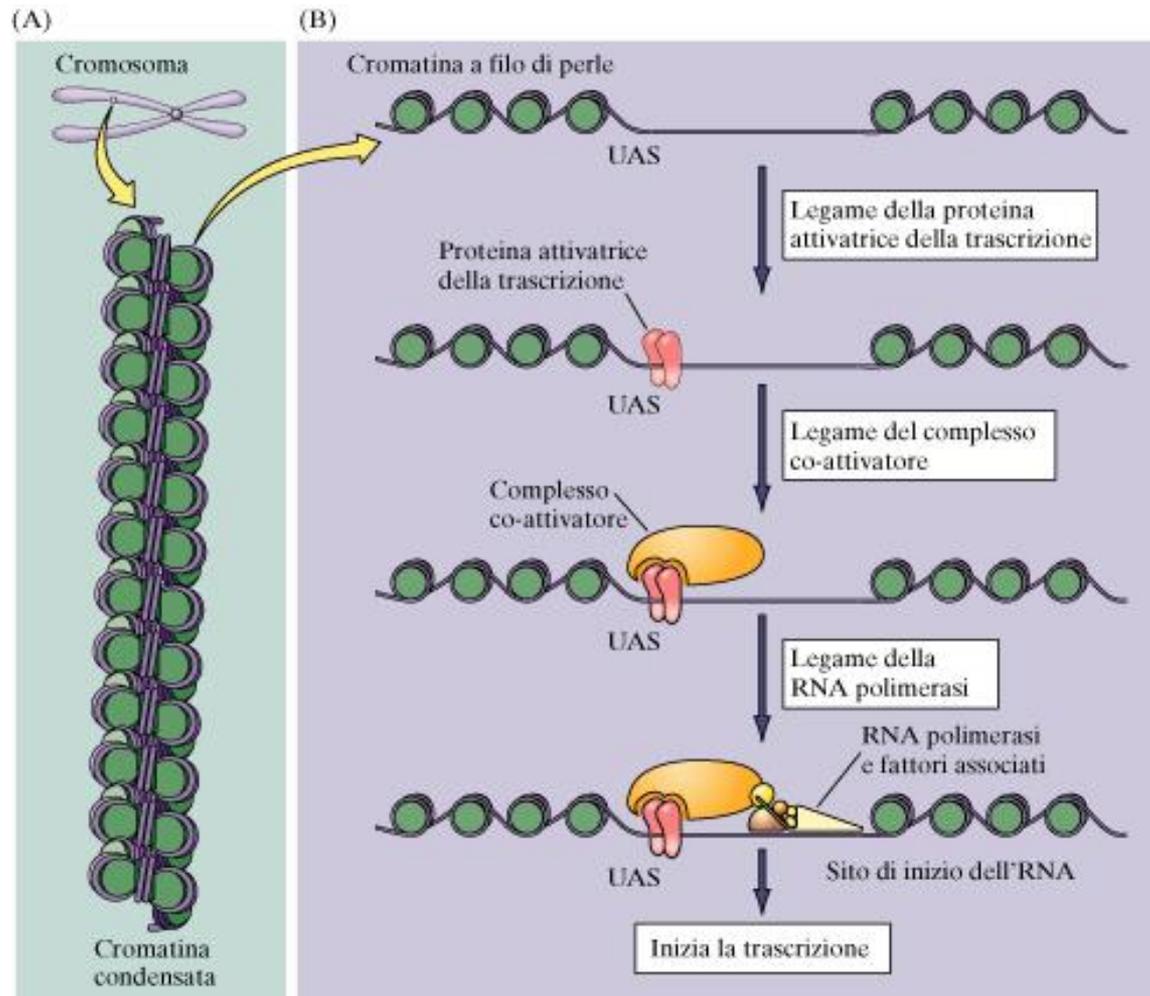


(C) PKC



Meccanismi di attivazione delle proteina chinasi. Le proteina chinasi contengono diversi domini specializzati con specifiche funzioni. Ogni chinasi possiede domini catalitici omologhi responsabili del trasferimento dei gruppi fosfati alle proteine substrato. Questi domini catalitici sono tenuti in uno stato inattivo dalla presenza di un dominio autoinibitore che occupa il sito catalitico. Il legame di secondi messaggeri come il cAMP, il DAG e il  $\text{Ca}^{2+}$  all'appropriato dominio regolatore della chinasi rimuove il dominio autoinibitore e permette l'attivazione del dominio catalitico. Per alcune chinasi come la PKC e la CaMKII, il dominio autoinibitore e il dominio catalitico fanno parte della stessa molecola. Per altre chinasi come la PKA il dominio autoinibitore costituisce una subunità separata.

L'accumulo di nuove proteine richiede almeno 30-60 minuti. L'inversione richiede ore o giorni. **Proteine di attivazione della trascrizione o fattori di trascrizione.**



La cromatina condensata è decondensata in una conformazione a filo di perle nel quale un sito di attivazione a monte (UAS) non contiene proteine ed è legato da un fattore proteico di trascrizione.

# Le funzioni cellulari di proto-oncogeni

- Oncogene cellulare (c-oncogene), sinonimo di **proto-oncogene**, deriva dall'oncogene virale (v-oncogene) dei retrovirus oncogeni
- **Oncogene** (= gene del cancro): gruppo di geni trovati per la prima volta nei retrovirus e responsabili dell'azione cancerogena
- Omologhi

- v-oncogeni: provocano la trasformazione maligna di cellule infettate
- proto-oncogene: funzioni essenziali nel mantenimento della vita
- I loro prodotti genici possiedono una posizione chiave come fattori di crescita, recettori di membrana, proteina cinasi e proteine nucleari leganti il DNA
- proto-oncogene *c-sis* codifica per il fattore di crescita PDGF
- proto-oncogene *c-erbB* codifica per il recettore che lega il fattore di crescita EGF

- Famiglia *ras*: responsabili per la sintesi di proteina cinasi
- I prodotti genici localizzati nel nucleo, come *c-myc* e *c-fos*, svolgono funzioni essenziali come fattori di trascrizione leganti il DNA
- All'aumentare della malignità, le cellule tumorali diventano sempre più indipendenti dai fattori di crescita esterni
- Presupposto: danneggiamento della trasduzione del segnale mediante espressione difettosa di proto-oncogeni

# L'attivazione di proto-oncogeni

- *Da danni genetici*

Il recettore di membrana per il fattore di crescita dell'epidermide EGF è prodotto in una forma modificata e non necessita più della stimolazione

 attiva continuamente la fosfolipasi  
 attivazione continua della proteina cinasi C e della molecola segnale da lei dipendente



Crescita e proliferazione modificate permanentemente e seriamente

- Stimolazione autocrina
- Proto-oncogene *erbB*: gene responsabile per l'espressione del recettore EGF e codifica anche per il complesso recettore membrana
- **Proto-oncogeni:** tutti quei geni che partecipano alla crescita e differenziazione della cellula
- Attivati a onco-geni contribuiscono con i loro prodotti genici modificati alla trasformazione di una cellula normale in una cancerosa

- Cambiamento di funzione dovuto a una mutazione = meccanismo di attivazione dei proto-oncogeni da mutazione
- *c-myc* per amplificazione genica (espressione proto-oncogene aumentata) → carcinoma polmonare
- p53 per delezione → carcinoma del colon
- Il gene per la proteina nucleare p53 modificato per mutazione puntiforme o delezione
- Nel ciclo cellulare p53 controlla l'inizio della fase della sintesi del DNA
- Insieme ad altri fattori come *c-myc*, gioca un ruolo importante nell'innesco dell'apoptosi
- **Geni soppressori di tumore**

# Il modello a più stadi della cancerogenesi chimica

## Iniziazione

- Danneggiamento irreversibile del genoma delle cellule indotte
- Singola dose sufficiente
- Relazione dose-effetto senza soglia d'azione

# Promozione

- Proliferazione delle cellule indotte
- Reversibile
- Attivazione di proto-oncogeni
- Proliferazione clonale delle cellule iniziate
- Alimentazione, ormoni che influenzano la promozione, crescita non autonoma
- Necessaria stimolazione continua
- Relazione dose-effetto con valore soglia
- Tumori benigni

# Progressione

- Aumento progressivo della malignità delle cellule
- Irreversibile
- Effetto genotossico
- Instabilità del cariotipo
- Attivazione di proto-oncogeni
- Crescita autonoma
- Tumori di malignità progressivamente maggiore

# L'iniziazione

- Cancerogeni diretti o indiretti (**cancerogeni finali**)
- L'entità è determinata nella cellula dall'attività degli enzimi disattivanti e attivanti e dai processi di riparazione
- Molti cancerogeni o i loro metaboliti si legano covalentemente al DNA e innescano le sintesi di riparazione del DNA

- *Formazione di addotti con il DNA o inserzione di molecole grandi planari*
- L'alchilazione destabilizza le macromolecole
- La perdita di basi puriniche avviene quando le posizioni N3 e N7 della purina sono alchilate
- L'alchilazione nella posizione O2 della pirimidina destabilizza il legame glicosidico
- La sintesi di riparazione procede con velocità differente a seconda del sito di alchilazione e dell'organo
- Gli addotti N3-metiladenina e O6-metilguanina sono eliminati nel fegato più velocemente di N7-metilguanina
- Velocità di divisione cellulare

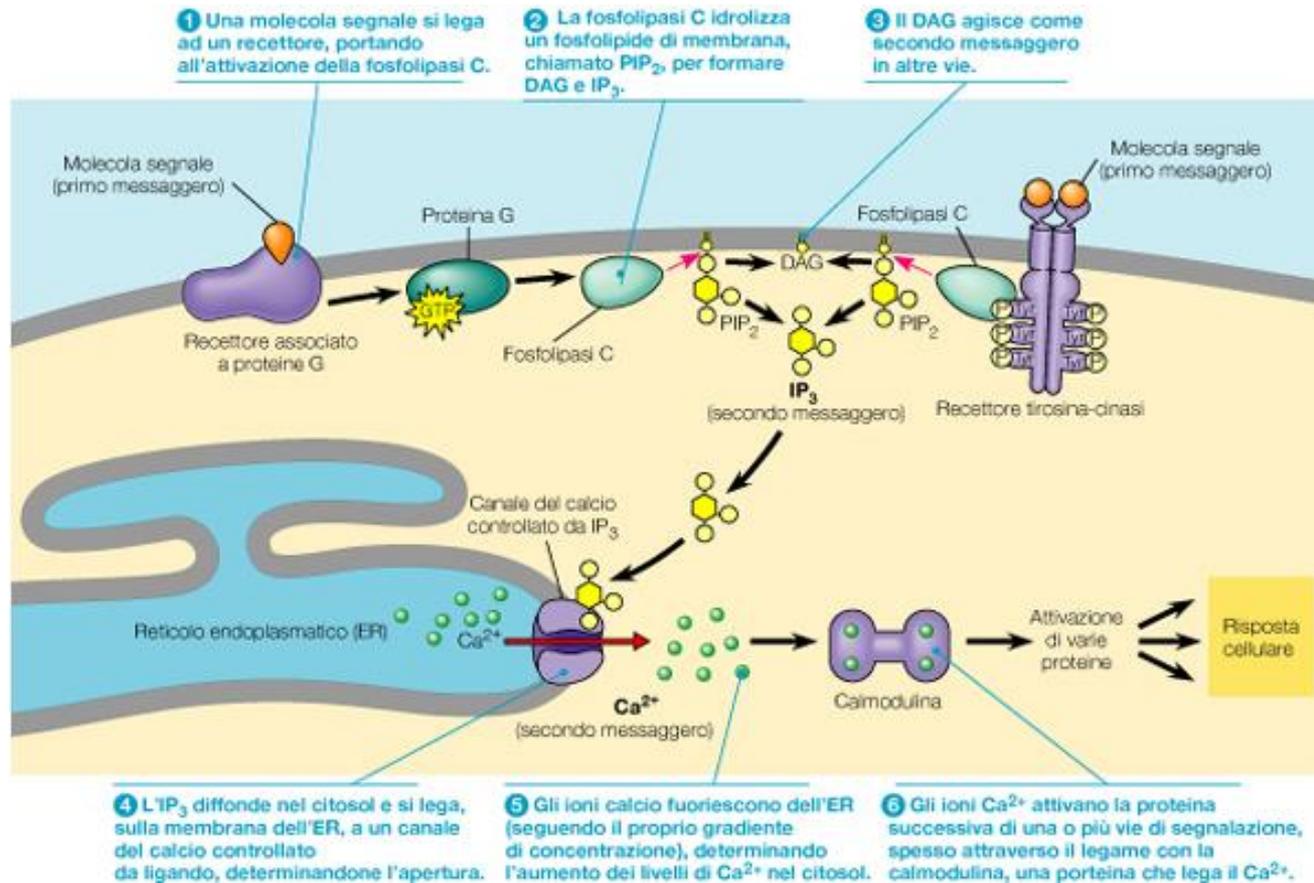
# La promozione

- Dalle cellule iniziate si formano popolazioni di cellule preneoplastiche
- Il loro aumento è dovuto a una maggiore velocità di mitosi e a una diminuzione dell'apoptosi
- *L'azione dei promotori tumorali è simile a quella degli ormoni: influenzano i canali di segnale, la regolazione della crescita e l'apoptosi*

I siti di attacco delle singole sostanze chimiche sono molteplici:

1. Legame a **recettori citoplasmatici**, migrazione nel nucleo e modificazione dell'espressione genica. Tali recettori si legano ai *responsive elements* e agiscono da rafforzatori della trascrizione. Es.: bifenili alogenati planari, dibenzo-*p*-diossine/furani
2. **Recettori di membrana**, influenzano i canali di segnale cellulari. Es.: estere del forbolo TPA, strutturalmente simile al substrato endogeno DAG, aumenta l'affinità della PKC (proteina cinasi C) per il  $\text{Ca}^{2+}$  e attiva l'enzima. Un compito del complesso PKC attivato consiste nel pilotare l'attività di diverse proteine nucleari (*c-fos* e *c-myc*). Differenza tra DAG e TPA: il primo è disponibile temporaneamente, il secondo è difficilmente decomposto

**Il calcio e l'inositolo trifosfato nelle vie di segnalazione.** Gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e l' $\text{IP}_3$  agiscono come secondi messaggeri in molte vie di trasduzione del segnale. Il processo comincia con il legame della molecola segnale ad un recettore associato a proteine G o ad un recettore tirosina-cinasi. I numeri indicano le tappe della prima via.



I livelli di calcio citosolico possono aumentare in risposta ad un segnale trasferito da una via di trasduzione, generalmente attraverso un meccanismo che implica il rilascio del  $\text{Ca}^{2+}$  dall'ER della cellula.

3. Legame maggiore di ROS, ioni Ca, ecc. (fattori dipendenti dal substrato) possono contribuire all'azione di promozione tumorale
4. Inibizione della comunicazione intercellulare, es. il TPA. Le sostanze messaggere a basso PM vengono scambiate per *gap junction*. I promotori possono diminuire rapidamente la loro permeabilità e in modo prolungato l'espressione delle proteine di esse

# I principi fondamentali del modello a più stadi

- Idrocarburi policiclici aromatici e nitrosamine hanno azione cancerogena sulla cute o sul fegato
- Per trattamento continuo si formano sulla pelle tumori benigni (**papillomi**), nel fegato i noduli
- Il 7,12-DMBA (7,12-dimetilbenzoantracene) è un induttore puro, il TPA agisce come promotore sulla cute

## 2 fasi della promozione della pelle:

- **Conversione:** le cellule iniziate sono poste nella condizione di reagire alla stimolazione mitogena del promotore “incompleto” mezerina. Può avvenire anche prima dell’induzione e l’effetto viene mantenuto per un tempo maggiore. Contiene una mutazione genetica
- **Propagazione:** crescita maggiore

- Cancerogeno del fegato dietilnitrosamina, iniziazione
- L'accumulo del promotore fenobarbital (derivato barbiturico) stimola la proliferazione di cellule normali e preneoplastiche, che però reagiscono maggiormente allo stimolo della crescita rispetto a quelle normali.
- Altri promotori nel fegato: inquinanti chimici, ad es. sostanze persistenti come gli idrocarburi clorurati. TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-diossina) promuove anche nella pelle
- Inducono i sistemi enzimatici dipendenti da citocromo P-450 che metabolizzano sostanze esogene

# Le sostanze cancerogene

- *Nitrosocomposti*: sono ubiquitari, negli alimenti (carni e salumi alla griglia e affumicati, nei formaggi, nella birra), nei cosmetici, negli inquinanti ambientali come i pesticidi, nell'industria della gomma, nelle concerie del cuoio e nella lavorazione dei metalli, nel fumo di tabacco.
- A livello endogeno le nitrosamine si formano nello stomaco per azione dei succhi gastrici dai nitriti e dalle amine secondarie
- L'attivazione metabolica avviene per ossidazione nel fegato, nei polmoni, nei reni con la monoossigenasi citocromo P-450 dipendente

- *Idrocarburi policiclici aromatici (IPA)*: si formano dalla combustione incompleta di sostanze organiche (catrame di carbone, gas di scarico delle auto, fumo nero dei motori diesel, catrame del fumo di tabacco, carne alla griglia mal cotta)
- *Amine aromatiche*: composti di sintesi impiegati nelle industrie o ottenuti come prodotti secondari nella sintesi di sostanze industriali. Devono essere attivate per via metabolica per poter svolgere azione cancerogena

- *Composti alchilanti diretti*: tumori a livello locale
- *Metalli*: As, Cr (VI), Ni, Cd. Il Cr (VI) viene assunto per trasporto anionico, il Cr (III) non riesce a penetrare la membrana. Il CdCl<sub>2</sub> è più solubile, + efficace del solfuro di Cd, meno solubile
- Danni al DNA provocati in modo secondario, per formazione di molecole reattive
- Danneggiamento della replicazione del DNA per formazione di un legame tra gli ioni metallici e il complesso DNA-DNA-polimerasi → diminuisce la frazione di coppie di basi non corrette
- Genotossicità dovuta anche ai danni indotti sui meccanismi di riparazione del DNA
- Meccanismi epigenetici: es. Cd<sup>2+</sup> può interagire *in vitro* con la cascata inositolo-calcio-proteina cinasi C

- *Sostanze naturali*: sostanze contenute nelle piante e prodotti del metabolismo di alcuni aspergilli.
- Es. aflatossina prodotta da *Aspergillus flavus*, fungo che cresce su substrati grassi, ad es. noci. Favoriscono la crescita del fungo il clima umido subtropicale e tropicale o condizioni inadeguate di immagazzinamento e produzione. L'aflatossina è attivata per via metabolica con la formazione di un epossido, che si lega all'N7 della guanina
- Noci della palma *Cycas* contengono la cicasina
- Pirrolisidinalcaloidi in piante del genere *Senecio*, *Crotalaria*, *Heliotropium* ed *Echium*

- *Asbesto e fibre minerali*: per inalazione tumore ai polmoni. Azione cancerogena, meccanismo non del tutto chiaro
- *Ormoni*: estrogeno naturale 17  $\beta$ -estradiolo, steroideo sintetico dietilstilbestrolo (DES)
- Estrogeni stimolazione proliferazione cellulare, azione promotrice nel modello a + stadi sui tumori al fegato e alla mammella iniziati da cancerogeni, cancerogeni epigenetici
- Ormoni steroidei: attivazione di geni e induzione sintesi proteine. Complesso ormone-recettore si lega a sequenze specifiche di DNA, hormon-responsive element (HRE), che modula la trascrizione e l'espressione genica. Alcuni proto-oncogeni (*c-fos* e *c-myc*) contengono HRE