

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO



*MASTER DI I LIVELLO IN
SENOLOGIA PER LE PROFESSIONI SANITARIE
BREAST NURSE*

*"Ruolo del cadmio e del selenio nel processo di carcinogenesi mammaria
e loro effetti sull'efficacia delle terapie".*

TUTOR:

Dott. Oscar Bertetto

CANDIDATO:

Alessandra Scrivani

DIRETTORE DEL MASTER: Prof.ssa Nicoletta Biglia

ANNO ACCADEMICO: 2013/14

“Non basta volere una cosa, ma bisogna lottare per raggiungerla. E io lo farò!

Perché i successi che contano sono quelli che ti costruisci con le tue forze.”

Alla mia mamma,

il mio papà,

la mia sorellona

e a tutti coloro

che vicini e lontani

hanno contribuito a render possibile

il raggiungimento di un nuovo traguardo.

GRAZIE.

Sommario:

<i>Introduzione</i>	1
1. <i>Capitolo 1: “Metalli e ambiente”</i>	4
1.1 <i>“I metalli pesanti”</i>	7
1.2 <i>“Il Cadmio”</i>	9
1.2.1 <i>“Tossicità del Cadmio per la salute dell’uomo”</i>	13
1.3 <i>“Il Selenio”</i>	16
1.3.1 <i>“Benefici e tossicità del Selenio per l’uomo”</i>	18
2. <i>Capitolo 2: “Carcinogenesi ormono-dipendente”</i>	20
2.1. <i>“Ormoni steroidei”</i>	23
2.2. <i>“Ruolo degli ormoni steroidei nel processo di carcinogenesi mammaria”</i>	25
2.3. <i>“Determinazione dei recettori per gli ormoni steroidei”</i>	29
3. <i>Capitolo 3: “Ruolo del Cd e del Se nel processo di carcinogenesi mammaria”</i>	30
3.1. <i>“Il Cadmio: importante antagonista degli estrogeni”</i>	30
3.2. <i>“Selenio: azione preventiva per il carcinoma della mammella”</i>	36
4. <i>Capitolo 4: “Trattamento terapeutico per il carcinoma mammario ormono- responsivo”</i>	39
4.1. <i>“Classificazione molecolare del carcinoma mammario”</i>	40
4.2. <i>“Trattamento terapeutico del carcinoma mammario”</i>	43
4.2.1 <i>“Tamoxifene”</i>	46
4.2.2 <i>“5-Fluorouracile”</i>	47
4.3. <i>“Interferenza del Cadmio con il 5-Fluorouracile”</i>	49
4.4. <i>“Selenio: fattore di rischio o agente preventivo?”</i>	51
<i>Discussione</i>	53
<i>Bibliografia</i>	57

Introduzione

L'obiettivo di questo lavoro consiste nel presentare attraverso una prospettiva laboratoristica, lo studio di metalli e relativi composti presenti in natura o rilasciati in seguito all'industrializzazione nel nostro ambiente, come possibili fattori coinvolti nel processo di carcinogenesi mammaria; ma non solo, è stato inoltre valutato il loro ruolo come possibili interferenti nella terapia.

La scelta di affrontare la tematica dei metalli come fattori di rischio o agenti di prevenzione, nasce sostanzialmente dall'esperienza nel "settore metalli" presso il laboratorio di analisi chimiche e ambientali nel quale lavoro da circa 3 anni; esperienza che ha arricchito molto non solo il mio bagaglio professionale ma anche culturale.

Tale esperienza, oltre ad aver ampliato la mia conoscenza, ha permesso di interrogarmi e riflettere sull'importanza particolare che, può assumere l'esposizione ad alcuni metalli nell'insorgenza del carcinoma mammario.

Studi epidemiologici indicano che l'esposizione a lungo termine ad alcuni metalli induce diverse forme di cancro, tra cui il cancro al seno.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità, il tumore al seno rappresenta il 16% di tutti i decessi per cancro a livello mondiale, con un totale di circa 500 mila decessi per cancro al seno.

È la neoplasia più comune diagnosticata per il sesso femminile e, sebbene l'incidenza aumenta con l'età e certo con lo stile di vita, anche l'esposizione ai fattori ambientali, come i metalli, potrebbe giocare un ruolo importante.

I fattori esterni, quali alimentazione, alcool, fumo ed esposizione ad agenti cancerogeni (ad esempio il Cd), giocano un ruolo determinante nella carcinogenesi del seno e sempre più prove sottolineano tale pensiero.

Un gran numero di studi epidemiologici associano i potenziali fattori di rischio quali Se e Cd con il rischio di carcinoma; mostrando come questi metalli potrebbero funzionare come interferenti degli estrogeni mentre altri sottolineano il collegamento tra l'esposizione (risultante da acqua potabile, aria e cibo) e il rischio di sviluppare il cancro.

Il presente lavoro discute quindi, i dati emergenti da studi condotti a sostegno dell'associazione degli effetti di metalli specifici (e loro composti) nell'indurre il cancro al seno così come, d'altra parte evidenzia gli effetti dei composti metallo-derivati utilizzati per il trattamento di questa neoplasia.

Sulla base di queste considerazioni cercherò di seguire un percorso che, partendo da alcuni concetti base della chimica giungerà poi, ad affrontare lo spinoso tema del carcinoma mammario metallo-indotto e di conseguenza la notevole influenza che questi metalli esercitano sulla terapia.

Il primo capitolo è dedicato al complesso tema dei metalli definendoli sotto il profilo chimico-fisico. In questo primo capitolo viene riportata la loro definizione e classificazione in "essenziali", "non essenziali" o "tossici" sulla base dei benefici o non che svolgono sull'organismo umano e le loro proprietà cancerogene. In fine sempre in questo capitolo si annoverano gli usi e le principali vie d'esposizione a specifici metalli.

Il secondo capitolo presenta la realtà del carcinoma mammario dal punto di vista puramente medico.

Più precisamente il secondo capitolo è dedicato interamente alla descrizione della carcinogenesi mammaria ormono-dipendente: si parte infatti da una definizione della malattia in termini d'incidenza proseguendo, paragrafo dopo paragrafo, nella descrizione della carcinogenesi ormono- dipendente, in quella degli ormoni coinvolti in tale processo e del ruolo che quest'ultimi assumono nella carcinogenesi.

Sempre in questo capitolo vengono anche descritte le metodiche d'analisi utilizzate nella routine per la determinazione dell'espressione dei recettori per gli ormoni estrogeno e progesterone, come fattori determinanti nella scelta della terapia adiuvante e nella prognosi del carcinoma mammario.

Dopo l'exkursus teorico fin qui esposto, il terzo capitolo è interamente dedicato ad un'attenta analisi degli studi presenti in letteratura, atti a descrivere il ruolo che i metalli Cd e Se rivestono nel processo di carcinogenesi.

Questo capitolo racconta lo studio condotto su linee cellulari MCF-7, descrivendone dapprima le caratteristiche che hanno portato alla loro scelta; utile per rappresentare l'attività e le proprietà estrogeno simili del Cd, in virtù delle quali quest'ultimo agirebbe da "Endocrine Distrupter".

Infine sempre in questo capitolo vengono anche riferiti i potenziali meccanismi chemio preventivi svolti dal Se e come una carenza o un supplemento di questo metallo nella dieta possa condizionare la regolazione della proliferazione cellulare, il differenziamento e l'apoptosi.

Il quarto capitolo che apre con un excursus storico sulla classificazione molecolare del carcinoma della mammella, si articola in modo tale da presentare a uno a uno i diversi trattamenti antitumorali impiegati nel debellare il tumore al seno, quali il trattamento chirurgico, la radioterapia, la chemioterapia e l'ormonoterapia.

In ultimo vengono approfonditi due studi condotti presso il dipartimento di "Scienze biomediche dell'Università di Sassari" atti a descrivere l'influenza del Cd sull'efficacia del 5-Fluorouracile, rappresentando la sua azione inibitrice.

Sempre in quest'ultimo capitolo viene approfondito il potenziale chemio preventivo e chemio terapeutico del Se, sostenuto da studi preclinici, clinici ed epidemiologici.

Capitolo 1

METALLI e AMBIENTE

La crosta terrestre è costituita da diversi elementi chimici di cui circa il 75% sono metalli (*Friberg L. Et al. 1971*).

I metalli (dal greco "metallon", che significa miniera e quindi minerale) sono elementi chimici solidi a temperatura ambiente, ad eccezione del mercurio (Hg); sono una eterogenea categoria di elementi duttili e malleabili, buoni conduttori di elettricità e di calore, fondono alle alte temperature e possono costituire delle leghe. Dei 103 elementi che compongono la tavola periodica ben 79 possono rientrare nel gruppo dei metalli.

Nella crosta terrestre si ritrovano in forma cristallina soprattutto 25 metalli (dal berillio allo zirconio) che rappresentano anche i più interessanti dal punto di vista tossicologico.

I metalli sono quindi naturalmente presenti nell'aria, nell'acqua, nel suolo e di conseguenza anche negli alimenti.

Tuttavia le attività umane hanno portato ad una progressiva dispersione nell'ambiente dei metalli stessi. L'uomo ha cominciato ad estrarre e lavorare i metalli almeno 4000-5000 anni or sono, ma con l'avvento dell'era industriale le attività estrattive, metallurgiche e di lavorazione dei metalli hanno determinato un aumento della dispersione nell'ambiente e costituiscono un fattore di rischio anche per la popolazione generale, oltre che per i lavoratori esposti.

Metalli e metalloidi (elemento che a seconda delle condizioni presenta proprietà e aspetto fisico dei metalli pur comportandosi chimicamente come un non metallo: Arsenico (As), Selenio (Se), Germanio (Ge), Antimonio (Sb), Tellurio (Te)) sono sostanze presenti nell'ambiente in qualità di elementi costitutivi dello stesso, nonché introdotti in seguito alle emissioni di tipo industriale.

Come rappresentato in Fig.1, l'attività umana rappresentata dalle industrie, dagli insediamenti urbani (intesi in particolare come scarichi di reflui e impianti di depurazione degli stessi), dalle attività di

miniera e agricole, comportano un rilascio nell'aria, nel terreno, nelle acque e quindi negli alimenti, di notevoli quantitativi di metalli (in particolare Cadmio (Cd), Zinco (Zn), piombo (Pb) e Mercurio(Hg)) che passano direttamente per dilavamento, dai terreni o legati ai sedimenti, nei bacini acquatici.

Qui, possono subire trasformazioni biologiche e chimiche che ne comportano un accumulo nell'ambiente (sotto forma di sedimenti), negli organismi, sia vegetali sia animali, esplicando così la loro azione inquinante. Tuttavia, le attività umane hanno portato ad una progressiva dispersione nell'ambiente.

I metalli possono essere assorbiti per via respiratoria, come fumi o polveri, per ingestione e raramente attraverso la pelle.

Nell'organismo, si legano prima alle proteine del sangue, per poi distribuirsi nei diversi compartimenti a seconda delle loro proprietà. I metalli vengono eliminati principalmente per via renale, come il mercurio (Hg) e il cadmio (Cd), oppure con la bile come arsenico (As), alluminio (Al) e manganese (Mn) e ritrovati nelle feci.

Nonostante i numerosi interventi svolti nell'ambito di piani nazionali ed internazionali tesi a limitare le emissioni di metalli pesanti nell'ambiente, molti dei quali effettuati con l'ausilio delle nuove tecnologie ed inseguito a limitazioni nell'impiego di alcuni elementi; alcuni di essi, come cadmio (Cd) e piombo (Pb), possiedono ancora oggi un ruolo tossicologico preminente, mentre altri, quali zinco (Zn), ferro (Fe) e rame (Cu), svolgono un ruolo fondamentale per il normale funzionamento degli organismi viventi, per cui sono definiti "elementi essenziali".

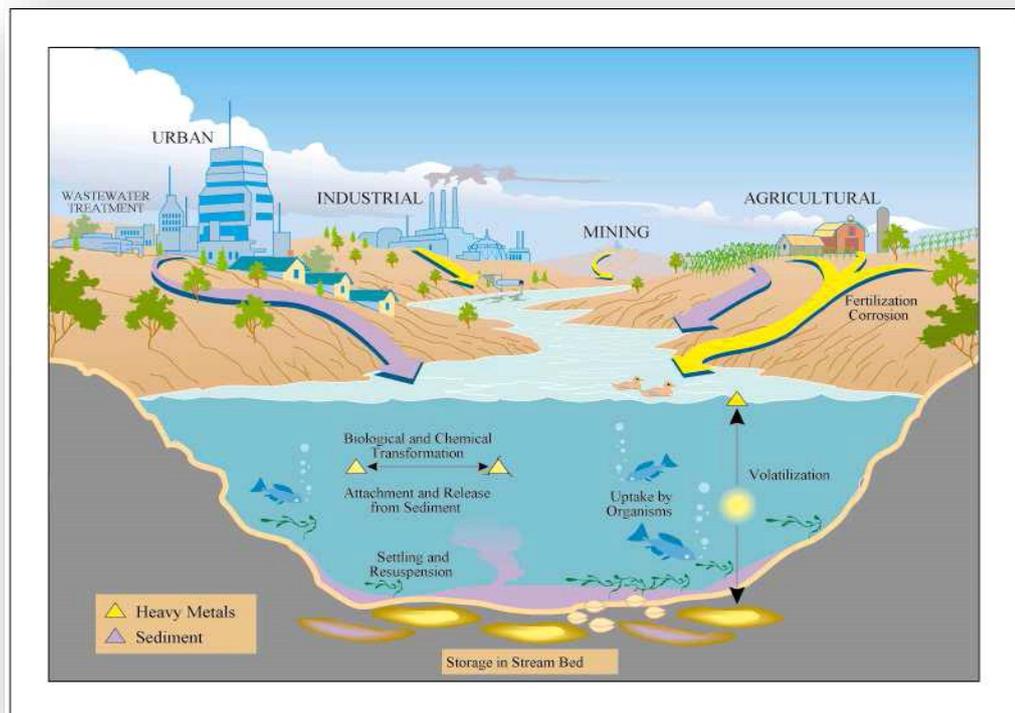


Fig.1 Fonti di inquinamento dei metalli pesanti

I metalli possono essere classificati in essenziali, non-essenziali o tossici.

Si definiscono *essenziali* i metalli necessari per alcune funzioni dell'organismo ma in concentrazioni marginali (oligoelementi o microelementi) quali: ferro (Fe), rame (Cu), zinco (Zn) il cui fabbisogno è dell'ordine di milligrammi; ed il vanadio (V), il cobalto (Co), il cromo (Cr), il manganese (Mn), l'arsenico (As), il selenio (Se) e il molibdeno (Mo) il cui fabbisogno è circa 1000 volte inferiore, vale a dire nell'ordine dei microgrammi.

Si definiscono *non-essenziali* o *tossici* quei metalli di cui non si conosce nessuna funzione biologica essenziale quali piombo (Pb), mercurio (Hg), cadmio (Cd), alluminio (Al), berillio (Be) e il nickel (Ni). Sia i metalli essenziali che i non-essenziali, se ingeriti in quantità sufficientemente elevata e per un certo periodo di tempo, sono potenzialmente tossici e possono danneggiare tessuti e organi.

Sono quindi importanti ai fini delle potenzialità del danno: la dose del metallo, la durata dell'esposizione, la via di assorbimento e la vita media del metallo.

I metalli si possono classificare in “leggeri” e “pesanti” in base al loro peso molecolare.

1.11 metalli pesanti

Con la definizione metalli “pesanti” vengono identificati quegli elementi chimici dal caratteristico aspetto lucido, che presentano le seguenti caratteristiche comuni:

- hanno una densità superiore a 5,0 g/cm³;
- si comportano come cationi, ossia come ioni dotati di carica positiva quando sono sottoposti ad un campo elettromagnetico;
- presentano una bassa solubilità dei loro idrati;
- hanno tendenza a dare vita a legami complessi;
- hanno una grande affinità con i solfuri, nei quali tendono a concentrarsi;
- hanno diversi stati di ossidazione a seconda delle condizioni di pH ed Eh.

I metalli pesanti, ad eccezione del Ferro (Fe) e dell'Alluminio (Al), appartengono ai cosiddetti “elementi in traccia”, presenti nei più comuni suoli e rocce della crosta terrestre in concentrazioni inferiori allo 0,1%. Le loro concentrazioni nei suoli, nei sedimenti e nelle rocce, sono solitamente di parti per milione (ppm) o per miliardo (ppb).

Nella letteratura scientifica vengono normalmente considerati metalli pesanti i seguenti elementi: alluminio (Al), ferro (Fe), argento (Ag), bario (Ba), berillio (Be), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), manganese (Mn), mercurio (Hg), molibdeno (Mo), nichel (Ni), piombo (Pb), rame (Cu), stagno (Sn), titanio (Ti), tallio (Tl), vanadio (V), zinco (Zn) ed alcuni metalloidi con proprietà simili a quelle dei metalli pesanti, quali l'arsenico (As), il bismuto (Bi) ed il selenio (Se).

I metalli pesanti sono molto resistenti alla degradazione naturale e mantengono inalterata la tossicità per lungo tempo; per questo motivo la loro concentrazione nell'ambiente dovrebbe essere tenuta sotto controllo ed a livelli molto bassi (*Friberg L. et al. 1971*).

Quando si parla di inquinamento da metalli pesanti, normalmente ci si riferisce a quattro di questi elementi, che sono i maggiori responsabili dei danni ambientali, ossia: il Hg, il Cd, il Pb e l'Al (*Benes S. et al, 2000*).

Le proprietà tossiche sono elevate sia per l'uomo che per tutte le specie viventi in quanto si legano alle strutture cellulari in cui si depositano, ostacolando lo svolgimento di determinate funzioni vitali per cui gli organismi spesso, non sono in grado di eliminarli (*Jarup L. et al. 2002/2003*).

Con la definizione metalli "pesanti" vengono identificati quegli elementi chimici dal caratteristico aspetto lucido, che presentano le seguenti caratteristiche comuni:

- hanno una densità superiore a $5,0 \text{ g/cm}^3$;
- si comportano come cationi, ossia come ioni dotati di carica positiva quando sono sottoposti ad un campo elettromagnetico;
- presentano una bassa solubilità dei loro idrati;
- hanno tendenza a dare vita a legami complessi;
- hanno una grande affinità con i solfuri, nei quali tendono a concentrarsi;
- hanno diversi stati di ossidazione a seconda delle condizioni di pH ed Eh.

I metalli pesanti, ad eccezione del Ferro (Fe) e dell'Alluminio (Al) appartengono ai cosiddetti "elementi in traccia", presenti nei più comuni suoli e rocce della crosta terrestre in concentrazioni inferiori allo 0,1%. Le loro concentrazioni nei suoli, nei sedimenti e nelle rocce, sono solitamente di parti per milione (ppm) o per miliardo (ppb).

Nella letteratura scientifica vengono normalmente considerati metalli pesanti i seguenti elementi: alluminio (Al), ferro (Fe), argento (Ag), bario (Ba), berillio (Be), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), manganese (Mn), mercurio (Hg), molibdeno (Mo), nichel (Ni), piombo (Pb), rame (Cu), stagno (Sn), titanio (Ti), tallio (Tl), vanadio (V), zinco (Zn) ed alcuni metalloidi con proprietà simili a quelle dei metalli pesanti, quali l'arsenico (As), il bismuto (Bi) ed il selenio (Se).

I metalli pesanti sono molto resistenti alla degradazione naturale e mantengono inalterata la tossicità per lungo tempo; per questo motivo la loro concentrazione nell'ambiente dovrebbe essere tenuta sotto controllo ed a livelli molto bassi (*Friberg L. et al. 1971*).

Quando si parla di inquinamento da metalli pesanti, normalmente ci si riferisce a quattro di questi elementi, che sono i maggiori responsabili dei danni ambientali, ossia: il Hg, il Cd, il Pb e l'Al (*Benes S. et al, 2000*).

Le proprietà tossiche sono elevate sia per l'uomo che per tutte le specie viventi in quanto si legano alle strutture cellulari in cui si depositano, ostacolando lo svolgimento di determinate funzioni vitali, per cui gli organismi spesso non sono in grado di eliminarli (*Jarup L. et al. 2002/2003*).

1.2 Il Cadmio

Il Cadmio (Cd) è un elemento metallico di colore bianco-argenteo, duttile e malleabile, di simbolo Cd e numero atomico 48; è uno degli elementi di transizione ed appartiene al gruppo IIB (o 12) della tavola periodica.

Il Cd fu scoperto in Germania nel 1817 da F. Stromejer in un campione del minerale calamina; la parola cadmio deriva dal latino "cadmia" e dal greco "kadmeia" ovvero calamina o cadmia.

Fonde a 321 °C, bolle a 765 °C, ha densità relativa 8,64 e peso atomico 112,412.

A temperatura ambiente si conserva inalterato per lungo tempo, ma se riscaldato in presenza d'aria si incendia facilmente e si trasforma nel corrispondente ossido (CdO), generando una fiamma brillante.



Fig. 2 Il Cadmio

Il Cd è un elemento piuttosto raro in natura (circa 0,2 ppm nella crosta terrestre) dove non esiste allo stato nativo.

Viene prodotto in discreta quantità come sottoprodotto della fusione dello Zn dal relativo minerale, la sfalerite (ZnS) o blenda, nel quale il Cd è un'impurità significativa, costituendo fino al 3%.

Ogni anno circa 25.000 tonnellate di Cd vengono rilasciate naturalmente nell'ambiente di cui la metà circa, si ritrova nei fiumi in seguito all'erosione delle rocce ed una piccola parte nell'aria come conseguenza degli incendi boschivi e dell'attività vulcanica. Il resto del Cd, tra 4000 e 13000 tonnellate, viene liberato nell'ambiente come diretta conseguenza sia dell'estrazione del metallo, prevalentemente come sottoprodotto della raffinazione di minerali di Zn, sia dell'uso dei combustibili fossili.

L'importanza relativa delle diverse fonti di Cd è riportata nella seguente tabella:

Concimi fosfati	41,3%
Uso di combustibili fossili	22,0%
Produzione di ferro e acciaio	16,7%
Fonti naturali	8,0%
Metalli non ferrosi	6,3%
Produzione di cemento	2,5%
Prodotti del cadmio	2,5%
Incenerimento	1,0%

Tab.1 Valori del 1998

Il Cd viene principalmente usato per la produzione di batterie energetiche ricaricabili cadmio-nichel, ritenute utili al sistema industriale perché di lunga durata e bassa manutenzione ed elevata resistenza a stress fisico ed elettrico.

Il Cd viene anche utilizzato nei materiali di rivestimento, per la buona resistenza alla corrosione, quindi utile negli ambienti marini e aerospaziali dove è richiesta sicurezza elevata del materiale.

Il Cd viene anche impiegato nella produzione di pigmenti, stabilizzatori per PVC, leghe e residui elettronici.

Inoltre, è presente come materiale di scarto in numerosi prodotti di uso casalingo e industriale, quali fertilizzanti a base di fosforo, detersivi ed i prodotti petroliferi raffinati.

Tra gli altri usi si annoverano:

- l'impiego in leghe metalliche basso fondenti e per saldatura;
- l'impiego in leghe metalliche ad alta resistenza all'usura;

- l'impiego nelle cadmiature, ovvero nel rivestimento di materiali con un film di cadmio metallico tramite elettrodeposizione;
- l'impiego come barriera per controllare le reazioni di fissione nucleare;
- l'impiego nella produzione di fosfori blu e verdi per televisori a colori;
- nella produzione di vernici di colore giallo, utilizzando il solfuro di cadmio che è un pigmento giallo;
- l'impiego in alcuni semiconduttori;
- alcuni composti del cadmio sono degli stabilizzanti per il PVC;
- il cadmio è stato usato per costruire il primo rivelatore di neutrini;
- in medicina il Cd, come altri ioni, serve come rivelatore delle immagini nella tomografia assiale computerizzata (TAC o TC);
- per la produzione di fanghi di depurazione e di presidi fitosanitari per l'agricoltura come pesticidi e fungicidi ed in molti fertilizzanti quali i concimi fosfati.

Sono molto numerosi i materiali insospettabili che lo contengono come ad esempio il tabacco le cui foglie lo assorbono dal suolo e dall'acqua di irrigazione per essere poi rilasciato nell'ambiente con il fumo; i forti fumatori assorbono approssimativamente il doppio del Cd assunto da tutte le altre fonti da parte dei non fumatori.

Lo si ritrova anche nelle protesi dentarie, nelle ceramiche e nelle stoviglie, nelle sostanze antiruggine, nei prodotti di scarto delle gomme ed infine anche nell'acqua potabile soprattutto quella dolce, in quanto le tubature metalliche degli acquedotti realizzate con il ferro galvanizzato possono con il tempo rilasciare il Cd nell'acqua.

Per avere un'idea concreta della quantità di Cd che ogni anno viene riversata nell'ambiente basti pensare che annualmente vengono introdotte sul mercato UE circa 190.000 tonnellate di batterie per uso industriale e 160.000 tonnellate di batterie per uso domestico. Ogni anno in Italia si consumano circa 300 milioni di pile.

1.2.1 Tossicità del cadmio per la salute dell'uomo

Il Cadmio (Cd) è tra i metalli pesanti, uno di quelli ritenuti più tossici per la salute dell'uomo, specialmente per la sua facile associazione con aria e acqua oltre che per la sua importante presenza nel fumo da sigaretta (*Nadkarni RA, 1974*).

L'incremento dell'industrializzazione e delle attività lavorative umane hanno da sempre portato ad un forte utilizzo di sostanze contenenti metalli pesanti, con il risultato di un'importante e considerevole eco-dispersione, con conseguenze economiche e sociali, potenzialmente dannose per la salute umana.

L'assorbimento del Cd nell'organismo umano può avvenire in diverse maniere, per inalazione, ingestione e per contatti con la cute.

Il Cd ha un'emivita piuttosto lunga, che è compresa tra i 15 e i 40 anni con una media intorno ai 20/25 anni. Si accumula molto facilmente nel fegato e nei reni. È considerato uno dei metalli pesanti più pericolosi, in particolare per l'uomo, a causa dei suoi effetti teratogenici e carcinogenici dimostrati scientificamente sia in vivo che su modelli animali.

Sia esso che i suoi composti sono tossici perfino a basse concentrazioni e tendono ad accumularsi negli organismi e negli ecosistemi.

Nelle persone non esposte professionalmente le principali cause di esposizione al cadmio sono il fumo di sigaretta (*Lewis GP et al, 2009*), incluso il fumo passivo, dove il metallo viene vaporizzato durante la combustione e il cibo contaminato introdotto nella dieta (*Galal GH et al, 1993*).

L'esposizione nell'uomo fumatore, di circa 20 sigarette al giorno, ammonta a circa 2- 4 µg.

Le derrate alimentari ricche di cadmio sono di varia origine, ad esempio alimenti particolarmente incriminati come potenzialmente contaminati da Cd dove sono state trovate le più alte concentrazioni di Cd, sono fegato e frattaglie di animali in genere, funghi, crostacei, molluschi e mitili, polvere di cacao, alghe secche. Altri alimenti potenzialmente contaminati da cadmio sono vegetali coltivati su terreni inquinati (da acque nere, fertilizzanti, acque di irrigazione a valle di siti industriali); pesci d'oceano (tonno, merluzzo, molluschi); cibi raffinati (farina, riso, zucchero bianco).

Consumo di acqua potabile contaminata (in caso di tubature galvanizzate o in plastica nera) e di bevande a base di cola o caffè istantaneo.

Generalmente per le persone che non fumano, la via principale di esposizione si ha attraverso gli alimenti. L'aggiunta di cadmio al terreno agricolo attraverso varie fonti (di lavorazione del terreno, di inquinamento ambientale e industriale) fa sì che venga coinvolta gran parte delle catene alimentari sino ad arrivare all'essere umano (*Fig. 3*).

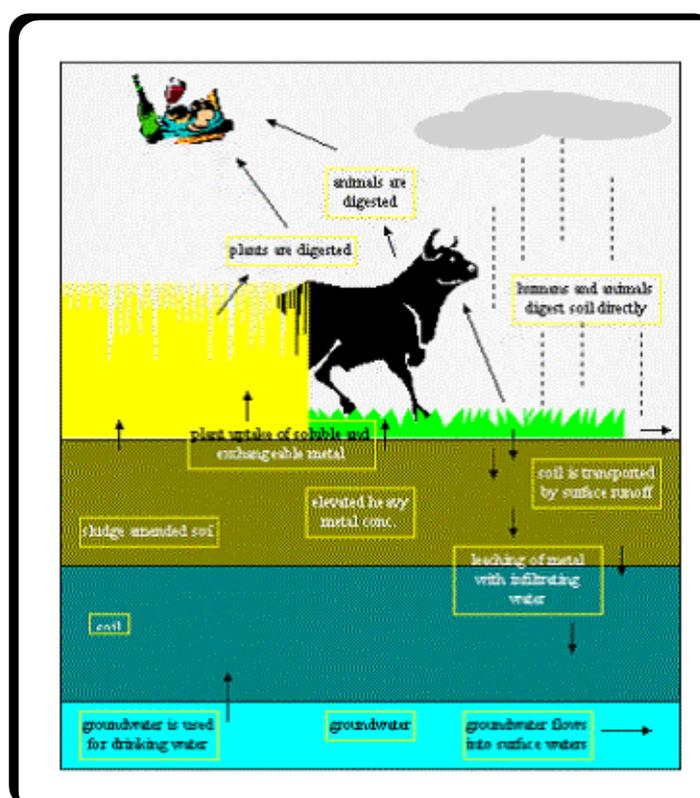


Fig. 3 "Ciclo" del Cadmio, dal suolo agli alimenti.

Da non sottovalutare l'esposizione al Cd di quelle popolazioni che vivono in zone nelle cui vicinanze sono presenti discariche di rifiuti o fabbriche di raffinazione del metallo che scaricano Cd nell'aria. Il cadmio è un metallo molto utilizzato in agricoltura e nell'industria, quindi è un importante contaminante ambientale.

I canali di scarico industriali sbocciano generalmente sul terreno.

La produzione di fertilizzanti artificiali a base di fosforo, porta ad una certa emissione di Cd. Una buona parte del Cd viene rilasciata, dopo l'applicazione del fertilizzante sul terreno da coltivare, la parte rimanente si deposita nelle acque superficiali.

Il Cd viene trasportato per lunghe distanze dal fango che si forma nelle acque andando a contaminare grandi estensioni di terreno e di corsi d'acqua superficiale; viene assorbito dalla materia organica del suolo e diventa fortemente pericoloso, entrando facilmente nel sistema della catena alimentare. Nei terreni acidificati, resi tali ad esempio da pioggia acida, si ha aumento dell'assorbimento di Cd da parte delle piante (*Tremlova J. et al, 2012*).

Altre possibili cause di inquinamento per l'uomo derivano principalmente per i lavoratori esposti professionalmente dalle fabbriche di smaltimento di pile e batterie contenenti cadmio, miniere, fabbriche di lavorazione di metalli tipo zinco, saldature delle lattine per alimenti, olio dei motori e scarichi d'automobile, vernici e colori, inceneritori di pneumatici, plastica e colori (*Maddeddu R. et al, 2012*).

Inoltre vi sono numerosi lavoratori a rischio di esposizione e contaminazione giornaliera al Cd: addetti alla produzione di leghe contenenti cadmio, addetti alla cadmiatura di oggetti metallici, addetti alla lavorazione di pigmenti contenenti cadmio, addetti alla saldatura di elettrodi contenenti cadmio (*Bonsignore A. 2012*).

Nel gennaio 2009 il gruppo CONTAM ha adottato un parere sul cadmio negli alimenti, in cui fornisce una valutazione aggiornata dell'esposizione in Europa e stabilisce una nuova dose settimanale tollerabile (TWI - Tolerable Weekly Intake).

Per la popolazione generale, ad eccezione dei fumatori, la fonte principale di esposizione al cadmio è rappresentata dagli alimenti. A seguito dell'analisi di nuovi dati, il gruppo CONTAM ha ridotto la TWI per il cadmio a 2,5 microgrammi per chilogrammo di peso corporeo ($\mu\text{g}/\text{kg}$ p.c.). Attualmente l'esposizione media al cadmio degli adulti attraverso la dieta si aggira intorno a questo valore e l'esposizione di determinati sottogruppi, quali i vegetariani e i fumatori, può essere superiore.

L'intossicazione da cadmio può essere combattuta anche col selenio. Gli alginati (contenuti nelle alghe) si combinano col cadmio e lo eliminano dal corpo, un procedimento che può prevenire l'avvelenamento.

Il Cd è un metallo pesante di interesse ambientale e professionale e a causa delle sue caratteristiche la International Agency for Research on Cancer (AIRC) e il Programma Nazionale di Tossicologia degli U.S.A. l'hanno classificato come “*cancerogeno di categoria I*”.

1.3 Il Selenio

Il Selenio è un microelemento scoperto verso la fine del XVIII secolo in una fabbrica svedese in seguito all'accumulo di un deposito rosso di composizione sconosciuta sulla parete di camere di piombo usate nella produzione di acido solforico (*Tingiggi U. 2003*).

Tale deposito venne analizzato nel 1817 dal chimico svedese, Jöns Jakob Berzelius, il quale riscontrò un elemento ignoto che chiamò Selenio.

Il selenio è un metalloide molto simile allo zolfo nelle sue caratteristiche chimiche.

E' caratterizzato da un peso atomico di 78.96 e un numero atomico di 34, un punto di fusione di 271°C e di ebollizione di 685°C.

E' stato stabilito essere nutriente essenziale a basse concentrazioni (0,1 ppm), parte integrante dell'enzima glutatione perossidasi (*Harr JR, 1978*), mentre ad alte concentrazioni è indicato come elemento tossico (*Morris J.et al, 1984*).

Per la sua complessa natura chimica il selenio si trova virtualmente in tutti i materiali della crosta terrestre.

La concentrazione totale del metalloide è stata determinata nelle rocce, nei terreni, nei fossili, nei gas vulcanici, nelle acque naturali, nei tessuti vegetali e animali (*Tab. 2*).

MATERIALE	Se (mg/kg)
Crosta terrestre	0,05
Polvere atmosferica	0,05-10
Piante graminacee	0,01-0,04
Orzo	0,2-1,8
Tessuti animali	0,4-4

Tab. 2 *Contenuto di selenio in diversi materiali.*

La quantità di selenio presente in un suolo è determinata essenzialmente da fattori geochimici, in particolare dalla natura della roccia madre.

L'elevata piovosità può provocare una notevole riduzione del contenuto di selenio, a causa della sua percolazione quando è presente in forme solubili.

Invece i fattori che ne influenzano l'accumulo da parte delle piante dipendono dalla quantità presente nel suolo e, soprattutto, dalla sua disponibilità che è essenzialmente dipendente dalla forma chimica in cui è presente, dal clima, dalla topografia, dall'età del suolo e dal suo utilizzo agricolo o industriale.

L'attività biologica svolge un ruolo importante nella sua distribuzione nell'ambiente.

La biogeochimica del selenio ed i parametri ambientali come pH e condizioni redox, ne influenzano fortemente la concentrazione, la mobilità e la distribuzione nell'ambiente.

Inoltre, è coinvolto in diversi processi fisici, chimici e biologici che includono: attività vulcanica, combustione di fossili (in particolare carbone), processi di erosione e lisciviazione di rocce e terreni, trasporto delle acque sotterranee, assorbimento e rilascio da parte di vegetali e animali, fenomeni di adsorbimento e desorbimento, reazioni redox chimiche e biologiche, formazioni di minerali ed incenerimento dei rifiuti urbani.

1.3.1 Benefici e tossicità del selenio per l'uomo

Nell'uomo, negli animali ed in alcune piante il selenio può essere utile, in alcuni casi essenziale (Underwood E.J, 1977), oppure tossico (Yang G. et al, 1993), in relazione alla sua concentrazione; è infatti un microelemento, e come tale presenta un intervallo tra soglia di deficienza e di tossicità estremamente ristretto (Russell E. W. ,1986).

Poiché sia un eccessivo che un carente assorbimento di selenio possono causare drammatiche conseguenze, questo elemento è considerato a doppia indole.

Problemi di carenza sono generalmente causati da basse concentrazioni di selenio negli alimenti, mentre problemi di tossicità dipendono dal suo accumulo all'interno dei tessuti. Il selenio è presente nel suolo ed entra nella catena alimentare attraverso le piante.

Gli alimenti che contengono le più alte concentrazioni di questo essenziale elemento sono rappresentati dal pane, dai cereali, dalla carne e dal pesce (Tab. 2.1).

ALIMENTI	Se (mg/kg ⁻¹)
Cereali e pane	0,01-0,55
Lenticchie	0,4
Carne, pesce, uova	0,01-0,36
Latte e derivati	<0,001-0,17
Frutta e verdura	<0,001-0,22

Tab.2.1 Alimenti e loro contenuto in selenio

A livello industriale il selenio veniva usato nei primi del '900 come pesticida nel controllo dei parassiti delle piante, mentre è ancora in uso come spray nel controllo di parassiti delle piante ornamentali (Rosenfield I., 1964).

Nel campo industriale il selenio è impiegato nell'industria elettronica per la produzione di rettificatori e cellule fotoelettriche, nell'industria del vetro e della ceramica come colorante e nell'industria della gomma come vulcanizzante. E' poi usato nella produzione dell'acciaio inossidabile, nell'industria delle materie plastiche e dei lubrificanti.

I livelli di selenio nei tessuti e nel sangue dell'uomo sono, quindi, governati dalla dieta e quest'ultima è a sua volta dipendente dalla distribuzione geografica del selenio nel suolo (*Brown K.M. e Arthur J.R.,2001*). Il fatto che la distribuzione del selenio nella maggior parte dei terreni sia altamente variabile, comporta gravi conseguenze per la salute umana.

Le dosi raccomandate dalla World Health Organization (WHO) sono riportate nella tabella sottostante (*Tab2.2*) (*Darmadiblackberry I,2001*).

ETÁ	Se ($\mu\text{g giorno}^{-1}$)
Bambini	
0-3 mesi	6
4-6 mesi	9
7-9 mesi	12
10-12 mesi	12
1-3 anni	20
4-6 anni	24
7-10 anni	25
Uomini	
11-14 anni	30-36
15-18 anni	40
19-50 anni	40
>50 anni	40
Donne	
11-14 anni	30
15-18 anni	30
19-50 anni	30
>50 anni	30
Donne in gravidanza	39
Donne durante l'allattamento	42-52

Tab.2.2 Dosi di selenio giornaliere raccomandate dalla World Health Organization (WHO)

Capitolo 2

CARCINOGENESI ORMONO-DIPENDENTE

Il carcinoma della mammella è la più frequente neoplasia maligna nelle donne.

L'incidenza, più alta nei paesi industrializzati dell'Occidente, nelle aree urbane e nelle classi sociali più elevate (*Wilson et al, 2004*), negli ultimi anni è notevolmente aumentata grazie al miglioramento dei mezzi diagnostici che consentono una diagnosi precoce della neoplasia.

In Italia si stima che ogni anno si registrino 300.000 nuovi casi di tumore al seno: a causa di un'incidenza così elevata, che rende questo tumore una malattia con un impatto sociale non trascurabile, e della sua elevata eterogeneità, vi è un forte stimolo mirato all'individuazione di nuovi marcatori, da affiancare a quelli già consolidati, per una più completa caratterizzazione molecolare della neoplasia.

Il carcinoma mammario si sviluppa dalle cellule epiteliali dell'albero ghiandolare e può originare diversi istotipi fra i quali i più frequenti sono il carcinoma duttale e lobulare. I due termini sono stati introdotti ritenendo che, la prima forma derivasse dai dotti principali e la seconda dai lobuli.

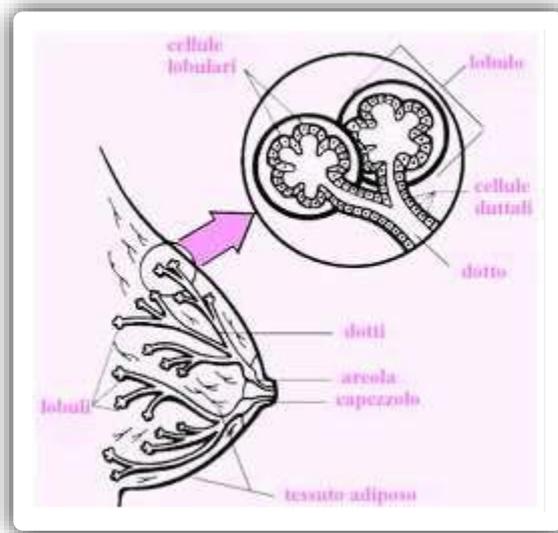


Fig.4 *Struttura normale della mammella*

Tuttavia la maggior parte dei carcinomi insorge a livello delle unità terminali dotto lobulari (TDLU) e successivamente per meccanismi non del tutto ancora conosciuti, dà luogo a tumori diversi sia dal punto di vista morfologico che per il comportamento biologico, come ad esempio l'espressione o meno della proteina di adesione intracellulare *E-caderina* (Lumachi F et al. 1997).

Per entrambi i tipi si riconoscono una forma in situ ed una forma infiltrante.

Il passaggio dalle strutture normali al carcinoma in situ avviene mediante la formazione di lesioni intermedie, diverse per i due tipi principali di tumore e indicate come lesioni preneoplastiche.

Analisi citogenetiche e di genetica molecolare hanno fatto emergere come lo sviluppo di un carcinoma primario della mammella, così come avviene anche per altre neoplasie, derivi da un processo multistep caratterizzato dall'accumulo di varie alterazioni genetiche (Beckmann et al, 1997). Tra i modelli esistenti, uno dei maggiormente riconosciuti è quello proposto da Wellings e Jansen (Fig.5), nel quale, a partire dall'epitelio normale, si può avere lo sviluppo di una iperplasia che, successivamente, può diventare lesione premaligna, carcinoma in situ ed infine carcinoma invasivo capace di metastatizzare (Wellings et al, 1973; Wellings et al, 1975).

Tale modello, inizialmente basato solo su evidenze istologiche, è rimasto valido anche alla luce delle più recenti scoperte. In particolare, queste ultime hanno mostrato come determinate alterazioni genetiche si mantengano durante l'evoluzione della lesione e come vi sia una forte correlazione tra il rischio di sviluppare un carcinoma invasivo e la tipologia della lesione precursore (*Allred et al, 2004*).

Questo implica che tutti i carcinomi invasivi inizialmente si sono sviluppati da lesioni in situ che, stocasticamente, hanno subito alterazioni genetiche ed epigenetiche che hanno influenzato la morfologia e le funzioni cellulari. Ciò tuttavia non significa che ogni carcinoma in situ progredirà a carcinoma invasivo.

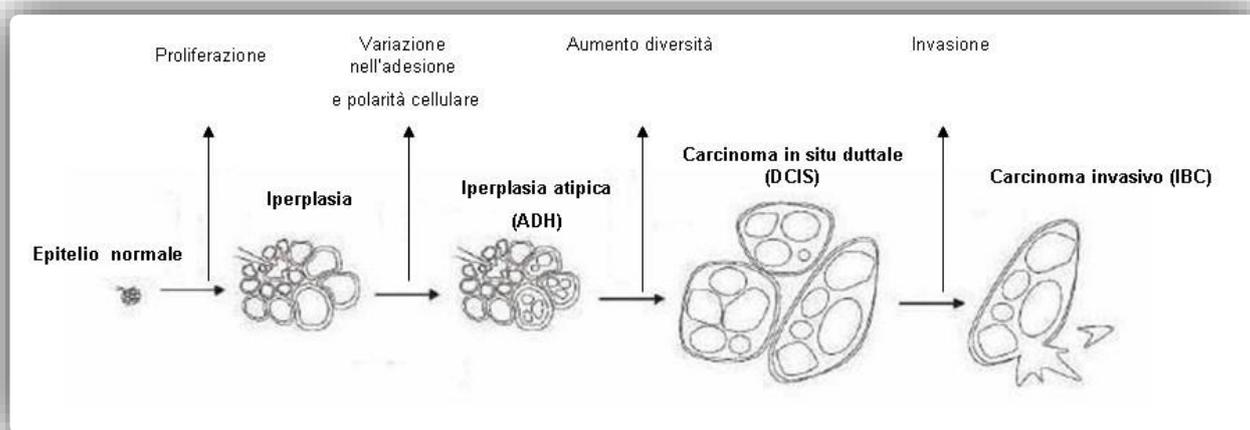


Fig.5 Modello di evoluzione del carcinoma mammario proposto da Wellings e Jensen. Il modello propone una progressione lineare continua, ma non obbligatoria, dall'epitelio normale al carcinoma invasivo.

La cellula da cui originano i carcinomi della mammella è importante per le sue implicazioni nell'eziologia e nel trattamento. L'ipotesi delle cellule staminali neoplastiche, suggerisce che le modificazioni maligne avvengano in una popolazione di cellule staminali con proprietà uniche che le distinguono dalle cellule differenziate (*Campbell LL et al. 2007*); solo queste contribuirebbero alla progressione o recidiva tumorale.

Il tipo di cellula che con maggior probabilità è all'origine della maggior parte dei carcinomi è la cellula luminale che esprime ER; la maggioranza dei carcinomi è infatti ER positiva e le lesioni pre-cancerogene come le iperplasie atipiche sono simili a questo tipo di cellule. I carcinomi ER negativi potrebbero invece, derivare da cellule mioepiteliali ER-negative; questo spiegherebbe il fatto di come molte proteine presenti nelle cellule mioepiteliali siano comuni nei tumori tripli negativi o basiloidi.

2.1 Ormoni steroidei

Gli estrogeni ed il progesterone sono ormoni di origine lipidica (steroidi) prodotti nelle ovaie a partire dalla pubertà, per questo sono definiti come ormoni sessuali femminili. Il termine estrogeno deriva dalla capacità di indurre l'estro. L'estrogeno ad azione più rilevante è il 17- β -estradiolo (17- β -E2 o E2), seguito dal suo stereoisomero α -estradiolo (17- α -estradiolo), e l'estrone (E1). L'estradiolo è un ormone molto potente ed agisce a piccolissime dosi, dell'ordine di grandezza dei picogrammi. In generale essi svolgono su tutto l'apparato riproduttore un'azione iperemica, iperplastica ed ipertrofica e svolgono un'importante funzione anche al parto, per la loro azione mio eccitatoria uterina.

Oltre che per il sistema riproduttore, sono molto importanti anche per il normale funzionamento del sistema cardiovascolare, per il metabolismo osseo e per lo sviluppo neuronale assieme al progesterone (*Mallepell et al. 2006; Finocchi & Ferrari 2011*).

Il progesterone (P4) è uno steroide, il cui nome deriva dalla sua funzione di preparazione e mantenimento della gravidanza. Esso viene prodotto dalle cellule del corpo luteo durante la fase luteinica ovarica sotto lo stimolo dell'LH (ormone luteinizzante), le concentrazioni a cui agisce sono più elevate rispetto a quelle degli estrogeni, dell'ordine dei nanogrammi. Per espletare appieno le sue azioni fisiologiche, infatti, il progesterone necessita che i tessuti abbiano precedentemente subito l'azione degli estrogeni.

Il meccanismo d'azione è quello comune agli ormoni steroidei: essendo lipofili, entrano nella cellula attraverso diffusione passiva e trasporto attivo e nel citoplasma si legano a recettori ER (Estrogen Receptor) e PR (Progesterone Receptor) citoplasmatici.

Mediante questi, vengono trasportati nel nucleo dove si legano a recettori nucleari che in realtà sono fattori di trascrizione ligando-indotti: con questi formano un complesso ormone-recettore che modula la trascrizione genica di una specifica sequenza di DNA di un gene promotore del ciclo cellulare (*Mallepell et al. 2006*).

Gli estrogeni ed il progesterone sono i principali fattori del corretto sviluppo e differenziazione del tessuto ghiandolare mammario, senza i quali esso non sarebbe possibile (*Lyndon et al. 1995; Korach et al. 1996*). A partire dalla pubertà gli estrogeni stimolano il sistema duttale rudimentale a proliferare, per formare un albero duttale complesso attraverso il tessuto adiposo della ghiandola, che trova il suo massimo sviluppo nella fase estrale di ogni ciclo. Il progesterone è il responsabile dello sviluppo alveolare che avviene in gravidanza ed in diestro, quando i suoi livelli sono elevati.

L'azione degli estrogeni dipende fortemente dalle loro isoforme recettoriali: sono principalmente due i recettori nucleari attraverso i quali gli estrogeni svolgono la loro azione proliferativa, l'ER α e l'ER β . Entrambi sono presenti nella ghiandola mammaria, ed attraverso prove di delezione su topi ne è emerso un ruolo differente: la delezione di ER β interferisce con la differenziazione terminale della ghiandola mammaria, ma non con la crescita duttale; la delezione di ER α si associa invece all'incapacità proliferativa del sistema duttale rudimentale che, in assenza dei TEBs (Terminal End Buds), non riesce a proliferare (*Mallepell et al. 2006*). I recettori ER α sono presenti anche nello stroma mammario, e, anche se non si ha piena comprensione del meccanismo, sembra che anche lo stroma rivesta un ruolo importante per lo sviluppo mammario, che avverrebbe attraverso una comunicazione di tipo paracrino tra ER, EGFR (recettore del fattore di crescita epiteliale) e FGFR (recettore del fattore di crescita fibroblastico).

Come già precedentemente affermato, il normale controllo dello sviluppo e differenziazione della ghiandola mammaria è complesso e coinvolge interazioni tra estrogeni e progesterone, ma anche tra altri ormoni sistemici (soprattutto prolattina e glucocorticoidi), fattori di crescita locali e citochine. È interessante notare che un ambiente ormonale simile sia necessario anche per la carcinogenesi mammaria. (*Sutherland et al. 1998*).

Il numero di ER e PR è influenzato dalla concentrazione degli stessi ormoni: gli estrogeni inducono la formazione di ER e PR, mentre il progesterone la diminuisce di entrambi (*Hulka et al. 1994*).

2.2 Ruolo degli ormoni steroidei nel processo di cancerogenesi mammaria

Gli estrogeni possono intervenire in tutte le fasi del processo di cancerogenesi mammaria: iniziazione/trasformazione, promozione e progressione.

I meccanismi possibili sono:

- l'induzione di una proliferazione cellulare abnorme attraverso lo stimolo degli ER: questo può avvenire sia per aumento della quantità di ormone presente (come in caso di obesità), sia per alterazioni strutturali dei recettori che diventano sensibili a minime quantità di estrogeni come quelle della donna in post-menopausa;
- effetto genotossico diretto mediato dal citocromo P450: i complessi del citocromo P450 hanno un ruolo nel catabolismo ossidativo degli estrogeni che porta alla produzione di radicali liberi che a loro volta sono causa di stress ossidativo e di danno genomico;
- azione diretta sul genoma con induzione di uno stato di aneuploidia.

Interessante è il possibile ruolo degli estrogeni ambientali come i fitoestrogeni e i pesticidi organo-clorurati.

Estrogeno e progesterone nel tessuto mammario influenzano la normale proliferazione, la differenziazione e la fisiologia cellulare, ma possiedono un ruolo primario anche nello sviluppo e progressione della neoplasia. La prima dimostrazione che il carcinoma mammario è dipendente dalla stimolazione estrogenica risale alla fine del XIX secolo quando Beatson dimostrò che era possibile indurre la regressione del carcinoma mammario metastatico in donne in premenopausa con ooforectomia (*Beatson GT, 1896*).

Il concetto che gli ormoni potessero aumentare l'incidenza di neoplasia è stato sviluppato, mediante studi sperimentali su estrogeni e neoplasia mammaria condotti su topi.

Questo concetto, ridefinito poi da studi successivi, consiste nel fatto che un'iperstimolazione ormonale, in assenza di altri iniziatori esterni, quali sostanze chimiche o radiazioni ionizzanti, produce negli organi responsivi (utero e mammella) una proliferazione cellulare che progredisce da normale ad iperplastica a neoplastica (*Henderson et al. 1988*). Allo scopo di individuarne il meccanismo eziopatogenetico ed eventuali indicatori prognostici, la ricerca si è focalizzata prevalentemente sugli estrogeni, per i quali è riconosciuto il ruolo predominante nella stimolazione della proliferazione epiteliale mammaria in vitro ed in vivo; mentre i progestinici rivestono un ruolo sia stimolatore sia inibitore sulla proliferazione delle cellule neoplastiche, ed in vitro l'effetto inibitorio sembra essere quello preponderante (*Musgrove et al. 1991; Sutherland et al. 1998*).

Uno dei meccanismi alla base dell'effetto inibitore del progesterone sembrerebbe legato al metabolismo degli estrogeni: nel tessuto mammario neoplastico il progesterone è in grado di aumentare l'attività enzimatica dell'enzima che converte l'estradiolo in estrone, la 17 β -idrosteroidodeidrogenasi, limitando così la produzione dell'estrogeno cruciale nella progressione neoplastica (*Hulka et al. 1994*) (*Fig. 6*).

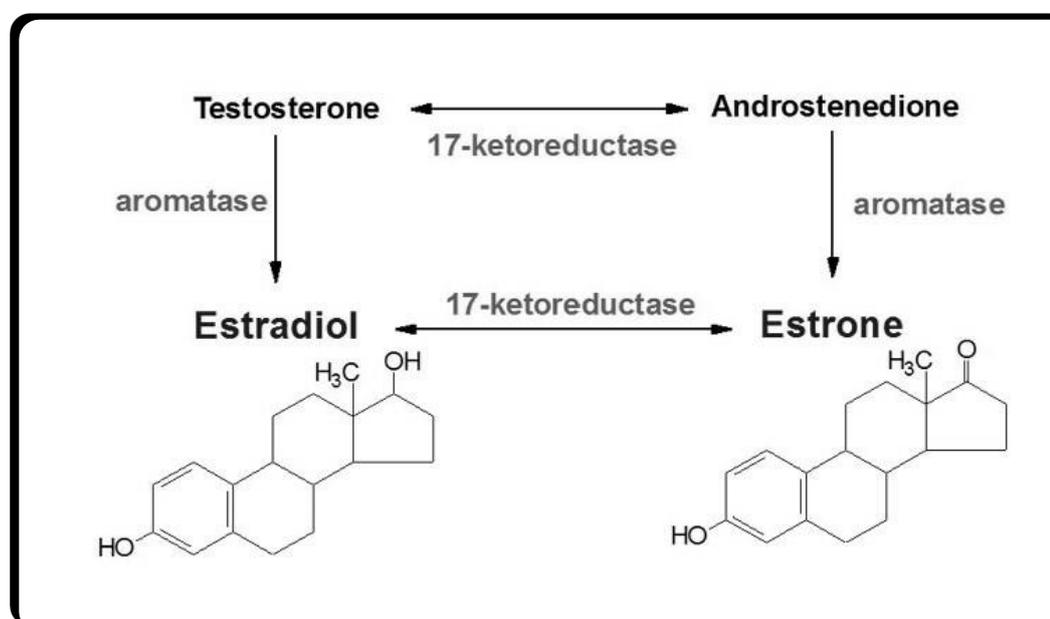


Fig.6 Biosintesi degli estrogeni.

In diversi studi relativi all'attività estrogenica è emerso che l'isoforma recettoriale con cui gli estrogeni esprimono la loro azione cancerogenetica in particolare sia l'ER α , che, di conseguenza, è stato ampiamente studiato per il suo valore prognostico. L'estradiolo stimola la proliferazione di colture di cellule mammarie neoplastiche esprimenti il recettore ER α , legandosi con elevata affinità e specificità al recettore.

Il recettore ER β , oltre a richiedere una maggior concentrazione ormonale, su cellule mammarie neoplastiche xeno trapiantate in topi, agisce come inibitore della proliferazione cellulare. Infatti, la sua concentrazione nella ghiandola mammaria è elevata nel tessuto sano e bassa nelle lesioni proliferative, così come il rapporto ER β : ER α , suggerendo un effetto protettivo del recettore ER β nei confronti dell'attività mitogena del recettore ER α , ed una possibile azione di soppressore tumorale (*Sahab et al. 2011*). Per comprendere il meccanismo d'azione mediante il quale gli estrogeni inducano una proliferazione di tipo neoplastico, si è studiato come essi intervengano nella progressione del ciclo cellulare: in cellule endometriali e mammarie di topi in vivo, gli estrogeni promuovono la proliferazione cellulare reclutando cellule quiescenti ad entrare nel ciclo cellulare, ed accorciano la fase G1 in quelle già ciclanti (*Schmitt, 1995; Sutherland et al. 1998*). Sia gli estrogeni sia gli anti-estrogeni esplicano la loro maggior azione sulle cellule che si trovano nella fase iniziale di G1 (*Doisneau-Sixou et al. 2003*). Vi sono numerose evidenze che l'effetto induttore di proliferazione neoplastica degli estrogeni sarebbe aumentato, anziché inibito, dall'azione progestinica (*Hulka et al. 1994*).

Ciò verrebbe in parte spiegato dal loro ruolo nella progressione del ciclo cellulare: in colture di cellule mammarie neoplastiche, il progesterone ad una prima fase accelera il passaggio dalla fase G1 alla fase S, poi invece lo rallenta, sincronizzando tutte le cellule nella prima fase di G1 del ciclo successivo. Il suo scopo sarebbe quello di inibire la proliferazione per stimolare la differenziazione, ma ciò in prima istanza produce una prima ondata proliferativa, ed in seconda sincronizza le cellule nella fase in cui sono più suscettibili agli estrogeni, favorendo così la progressione neoplastica. Le apparenti contraddizioni sugli effetti del progesterone vengono inoltre in parte spiegate da un modello recentemente proposto in cui viene sottolineata l'importanza dei diversi metaboliti derivanti dal progesterone: questi agirebbero come ormoni indipendenti con azioni opposte sul ciclo cellulare, sull'apoptosi e sull'interazione con molecole cito scheletriche e di adesione.

I geni coinvolti nell'induzione della progressione del ciclo cellulare da parte del complesso ormone-recettore sono più probabilmente c-Myc e cyclin D1, con conseguente attivazione di Cdk4. Il loro ruolo centrale suggerisce che una loro espressione aberrante possa contribuire ad alterare la sensibilità agli steroidi con conseguenti effetti sull'evoluzione, il fenotipo e la prognosi del tumore mammario.

A sua volta l'esistenza di varianti recettoriali ER e PR con funzioni aberranti comporterebbe un'anormale trascrizione dei suddetti geni. Secondo altri autori i normali effetti proliferativi degli ormoni comporterebbero una progressione da tessuto sano a iperplasia a neoplasia; i fenotipi maligni sarebbero il frutto di errori nei meccanismi della divisione cellulare (errori nella copia di DNA, traslocazioni cromosomali ecc.).

I carcinomi della mammella ER α positivi sono associati a un basso indice di proliferazione, basso grado istologico, diploidia del DNA e quindi sono associati a una buona prognosi (Ross JS et al. 2005). Più del 90% dei carcinomi lobulari sono ER-positivi mentre i carcinomi midollari ed infiammatori sono più frequentemente ER-negativi. Tumori negativi per entrambi i recettori ormonali sono spesso associati ad un comportamento più aggressivo e presentano amplificazione dei geni HER-2/neu, c-myc e mutazioni nel gene p53 (Taneja P et al. 2010).

La determinazione del recettore progestinico PgR, ulteriore proteina regolata dagli estrogeni (Jensen EV et al. 2003; Fournier A et al. 2008), migliora la discriminazione tra neoplasie mammarie sensibili e non alla terapia ormonale.

Tumori che esprimono PgR ma non ER, rappresentano meno dell'1% di tutti i casi di carcinoma della mammella (Viale G et al. 2007).

Un' elevata concentrazione di ER e PgR non è solo predittiva della risposta alla terapia ormonale, ma dato che, in genere la loro presenza si accompagna ad una maggiore differenziazione, può essere utile anche nella stima della sopravvivenza libera da malattia (Bast RC et al, 2001).

2.3 Determinazione dei recettori per gli ormoni steroidei

La determinazione dei recettori per gli ormoni steroidei è uno dei fattori determinanti nella scelta della terapia adiuvante e nella prognosi del carcinoma mammario. La valutazione dell'espressione dei recettori ormonali viene routinariamente condotta mediante analisi immunoistochimica, che ha sostituito il tradizionale metodo basato sulla valutazione biochimica del legame tra recettore e ligando (dextran-charcoal radioactive binding assay), indicando il risultato come percentuale di cellule positive.

La risposta terapeutica è migliore quando sono presenti entrambi i recettori. Attualmente viene valutata la positività nei nuclei, in quanto la localizzazione nucleare dei recettori è ben nota. La tecnica di colorazione immunoistochimica è attualmente la tecnica d'elezione per indagare la presenza ed effettuare una valutazione semi quantitativa dei recettori per estrogeni e progesterone su un campione di tessuto. Essa sfrutta la formazione di complessi antigene-anticorpo che vengono evidenziati con un colorante specifico, e rispetto le metodiche precedenti, ha il vantaggio di mantenere la stratigrafia del tessuto e pertanto di poter localizzare ed individuare le cellule in cui è avvenuta la reazione.

Il metodo immunoistochimico richiede un'attenta valutazione di tutti gli aspetti tecnici e interpretativi, al fine di garantire un'adeguata qualità del test.

I punti critici che occorre considerare comprendono:

- procedura di fissazione dei campioni,
- procedure di recupero dell'antigenicità;
- tipo di anticorpi utilizzati;
- quantificazione delle reazioni;
- controlli interni ed esterni.

La valutazione della positività alla colorazione immunoistochimica viene effettuata mediante osservazione al microscopio ottico della percentuale di cellule epiteliali che presentano i nuclei di colorazione brunastra. Da oltre venti anni la determinazione immunoistochimica sui tessuti tumorali dei recettori ormonali (recettori per estrogeno e progesterone) è utilizzata per una corretta valutazione biologica di tali parametri, al fine di poter dare al clinico precise indicazioni terapeutiche. Circa il 60-75% di tutti i tumori mammari esprime i recettori per gli estrogeni e circa il 55-70% quelli per il progesterone (*Beckmann et al, 1997*).

Capitolo 3

RUOLO DEL Cd E DEL Se NEL PROCESSO DI CARCINOGENESI MAMMARIA

Un'azione analoga a quella svolta dagli estrogeni possono svolgerla alcuni metalli definiti “metalloestrogeni”.

I metalloestrogeni sono metalli che attivano il recettore degli estrogeni in assenza di Estradiolo; si dividono in due sottoclassi: *anioni metallo / metalloidi* e *metalli cationici bivalenti*.

Gli anioni metallo / metalloidi sono composti come arsenite, nitriti, selenite, mentre i cationi bivalenti includono metalli come cadmio, calcio, cobalto, rame, nichel, cromo, piombo, mercurio e stagno. Il metalloestrogeno più studiato è il cadmio.

È stato suggerito che l'alta incidenza di malattie ormonali, come il cancro al seno, è dovuto, in parte, alla presenza di estrogeni ambientali.

Un'esposizione cronica ai metalli rappresenta un importante fattore di rischio nell'insorgenza di tumori nella popolazione.

3.1 Il Cadmio: importante antagonista degli estrogeni

L'alta incidenza nel mondo occidentale di patologie e tumori ormono-dipendenti è stata messa in relazione con gli estrogeni presenti nell'ambiente, in grado di legarsi ai recettori per gli estrogeni presenti nei tessuti bersaglio e di attivarli.

Il Cadmio è un metallo pesante al quale recentemente sono state attribuite attività e proprietà estrogeno-simili; in virtù di tali proprietà il cadmio agirebbe come “Endocrine Disrupter” (*Esmeralda P. et Al. 2013*).

Il Cadmio probabilmente agisce in tutte le fasi del processo oncogeno attraverso molteplici meccanismi:

- aumento della sintesi di DNA;
- stimola l'espressione di proto-oncogeni e fattori di trascrizione, di proteine da stress;

- determina un innalzamento dei livelli di varie citochine pro infiammatorie e dell'attività di numerose chinasi;
- bypass apoptotico;
- metilazione del DNA alterato (*Lamia B. et al.*).

Il Cadmio sembra avere effetti sulla proliferazione di alcune linee cellulari, contribuendo allo sviluppo del fenotipo neoplastico in svariate forme di tumore umano compreso il cancro della mammella.

L'esposizione al cadmio potrebbe avere un ruolo chiave nell'insorgenza e nella progressione del carcinoma mammario, essendo un importante antagonista degli estrogeni.

Numerosi studi presenti in letteratura hanno utilizzato linee cellulari MCF-7, linea cellulare di cancro della mammella di origine umana, per valutare gli effetti del trattamento con il cadmio, sia sulla morfologia cellulare sia sull'angiogenesi in vivo, determinata dalle stesse cellule.

La linea cellulare MCF-7 è una linea di tumore mammario isolata nel 1970 da una donna Americana Caucasica di 69 anni.

Prima di ottenere la linea cellulare MCF-7, era cosa impensabile per un ricercatore nel campo della ricerca oncologica ottenere una linea di cellule mammarie in grado di sopravvivere in coltura cellulare abbastanza a lungo (diversi mesi) da poter completare degli esperimenti di laboratorio in vitro.

Le caratteristiche principali delle MCF-7 sono quelle di essere:

- un tumore primario con le potenzialità di essere un carcinoma invasivo,
- originate da effusione pleurale,
- con presenza di recettori per gli estrogeni,
- con risposta proliferativa positiva agli estrogeni,
- con presenza di recettori progestinici,
- con potenziale tumoregenicità nel topo da esperimento in presenza di supplemento estrogeno,
- con fenotipo di cellula epiteliale luminale (*Lacroix M. 2004; Lacroix M. 2006*).

Questa linea cellulare possiede diverse caratteristiche delle cellule dell'epitelio mammario differenziato, compresa la capacità di metabolizzare l'estradiolo per via dei recettori per gli estrogeni citoplasmatici. Le cellule MCF-7 sono ritenute linea cellulare di controllo estrogen-receptor (ER) positive (*Levenson AS. 1997*).

Inoltre in aggiunta alla sensibilità agli estrogeni, le MCF-7 sono ritenute sensibili anche alla citocheratina. Quando si allestiscono colture cellulari in vitro, le cellule sono in grado di formare dei tappeti monostratificati di cellule di natura epiteliale.

L'epitelio ghiandolare è molto utile negli studi riguardanti i collegamenti con gli estrogeni e l'associazione cadmio-estrogeni, considerando la capacità del cadmio di mimare gli effetti degli estrogeni legandosi ai recettori di membrana (*De Pasquale J.1999; Ehlers EM.1999 Garcia-Morales P.1994*).

L'allestimento di modelli in vitro con le linee cellulari di carcinoma mammario MCF-7 ha permesso di approfondire lo studio dei meccanismi di citotossicità correlati al Cadmio (Cd) presente in varie situazioni ambientali, ad esempio contaminazione in ambienti di lavoro e fumo di sigaretta, ed il carcinoma mammario.

Le cellule della linea MCF-7 sono state fatte crescere in condizioni standard.

Per gli esperimenti è stato utilizzato un medium a base di terreno senza rosso fenolo addizionato con il 5% di siero fetale bovino privato degli estrogeni.

La morfologia è stata valutata mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) mentre per lo studio dell'angiogenesi in vivo è stato utilizzato il saggio della membrana corion allantoidea dell'embrione di pollo (CAM). Le cellule e il loro medium condizionato (MC) sono stati testati sulla CAM prima e dopo trattamento di 48 ore con cloruro di cadmio alla concentrazione di 10 μM .

L'analisi morfologica ha messo in evidenza che, dopo il trattamento con Cloruro di Cadmio, le cellule presentano una superficie liscia, in cui sono scarse o addirittura assenti le vescicole di secrezione, caratteristiche invece, delle cellule di controllo non trattate con il Cadmio.

Il saggio angiogenico in vivo effettuato sulla CAM rileva che dopo l'esposizione a Cloruro di Cadmio, sia le cellule trattate che il loro medium MC inducano una risposta angiogenetica che è significativamente meno intensa rispetto a quella indotta dalle cellule MCF-7 non trattate e usate come controllo.

Il Cloruro di Cadmio, testato direttamente sulla CAM, non contrasta in modo significativo l'angiogenesi indotta dalla prostaglandina E1, potente agente stimolante l'angiogenesi, utilizzata come controllo positivo.

I risultati ottenuti suggeriscono che l'esposizione delle MCF-7 a concentrazioni non citotossiche di Cloruro di Cadmio, determina una riduzione dell'attività secretoria e del potenziale angiogenetico di questa linea cellulare.

Ulteriori studi sono stati eseguiti su linee cellulari MCF-10A, cellule normali di epitelio mammario, valutandone la trasformazione in cellule cancerogene dopo esposizione cronica a bassi livelli di cadmio. Le cellule MCF-10A sono spesso utilizzate come controllo normale in studi sul cancro al seno e sono considerate negative per ER- α ed ER- β , ma possono mostrare attivazione ER con trasformazione maligna. La capacità di attivare direttamente un fenotipo maligno nelle cellule epiteliali del seno, sembrerebbe rafforzare in modo significativo i dati emergenti sulle cellule della mammella come bersagli della carcinogenesi indotta dal cadmio.

In questo studio è stata valutata la capacità dell'esposizione cronica a bassi livelli di cadmio, di indurre la trasformazione della linea cellulare MCF-10A da ER-negativo in fenotipo maligno, utilizzando cellule di varie misure, tra cui MMP-9 (Matrix metalloproteinase-9), enzima in grado di degradare la matrice extracellulare e facilitare l'invasione delle cellule tumorali. Un marcato e progressivo aumento della secrezione di MMP-9 si è verificato con l'esposizione al cadmio. Con 40 settimane di esposizione, le cellule cadmio esposte hanno iniziato la formazione di focolai cellulari; questi raggruppamenti indicano una perdita dell'inibizione da contatto, che permette alle cellule di continuare a dividersi e formare più strati orizzontali, tipica caratteristica delle cellule tumorali.

La formazione di focolai cellulari comune per le cellule trattate con cadmio, è stato raramente osservata nelle cellule di controllo.

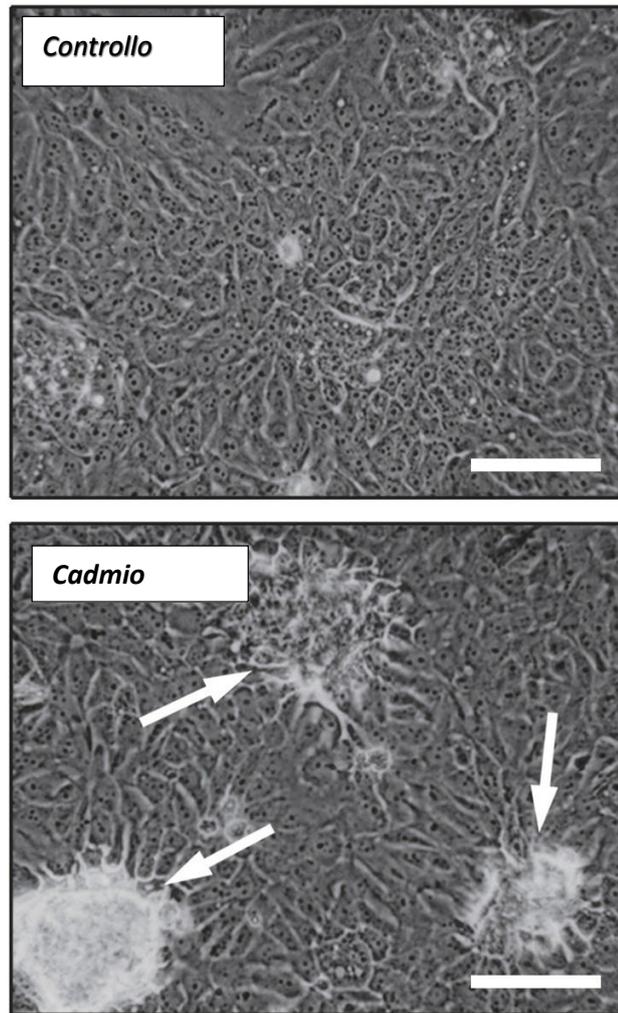


Fig.7 Perdita d'inibizione da contatto con formazione di focolai cellulari, non riscontrabili nel controllo, in seguito ad esposizione al cadmio di 40 settimane.

Questo studio ha dimostrato che le cellule epiteliali del seno umano ER-negativo subiscono la trasformazione con l'esposizione cronica al cadmio. Tuttavia, le cellule rimangono ER-negativo dopo l'acquisizione del fenotipo maligno in vitro e anche dopo la produzione di tumori xeno trapiantati in vivo.

Infatti, il cadmio produce un fenotipo Basal-like:

- negatività del recettore per gli estrogeni (ER);
- negatività di HER-2;
- ridotta espressione del gene BRCA1;
- aumentata espressione p63 e CK5;

Un meccanismo d'azione proposto per il cadmio è che questo agisca mimando l'azione del recettore per gli estrogeni(ER α), attivando cronicamente percorsi estrogeno-correlati che predispongono allo sviluppo di cancro al seno.

Il cadmio è stato collegato al cancro al seno umano in uno studio di popolazione, caso-controllo recente.

Sulla base del cadmio urinario, sia il rischio di cancro al seno che l'aggressività del tumore, sono aumentati con l'aumento dell'esposizione.

Questo è coerente con i dati raccolti nel succitato studio, nel quale il cadmio in vitro induce la trasformazione in fenotipi cellulari maligni altamente aggressivi.

La trasformazione diretta di cellule epiteliali mammarie in fenotipo maligno indotto dal cadmio, sostiene con forza i dati epidemiologici emergenti che sostengono un ruolo del cadmio nel processo di carcinogenesi mammaria.

I fattori ambientali rappresentano una porzione significativa (60%) dei fattori di rischio che possono indurre il carcinoma della mammella.

La crescente incidenza e variazione geografica del cancro al seno umano ha cominciato a focalizzare l'attenzione sul potenziale eziologico di altri fattori ambientali. Il cadmio, comune inquinante ambientale, è considerato uno tale.

Dal momento che i meccanismi del Cadmio, non sono ad oggi completamente noti, è possibile ipotizzare che questo metallo pesante possa da un lato attivare vie di segnalazione intracellulari responsabili dell'incontrollata proliferazione cellulare e dall'altro attivare vie di segnalazione che influiscono sul potenziale angiogenetico di queste stesse cellule.

L'integrazione dei dati ottenuti dagli studi hanno migliorato la nostra comprensione dell'interazione dei metalli ed in particolare del Cadmio con la fisiologia cellulare e le possibili implicazioni nell'insorgenza del cancro al seno.

3.2 Selenio: azione preventiva per il carcinoma della mammella

Il selenio è un microelemento di fondamentale importanza per la salute umana (*Rayman, 2000*).

Questa consapevolezza venne acquisita quando, nel 1957, Schwarz e Foltz scoprirono il suo ruolo protettivo contro la necrosi del fegato in ratti carenti di vitamina E.

Da allora le ricerche che si sono succedute per svelare tutte le implicazioni a breve e lungo termine del selenio nella salute umana sono state numerose.

Oggi sappiamo che questo importante metalloide è incorporato come selenocisteina nel sito attivo di un ampio range di proteine.

Sotto condizioni fisiologiche, il selenio presente nella selenocisteina, è quasi completamente ionizzato, e ciò lo rende un catalizzatore biologico estremamente efficiente.

Selenio (Se) è un oligoelemento essenziale per molti processi biologici e possiede proprietà anti-cancerogene.

La carenza di Selenio può contribuire sulla carcinogenesi mammaria in quanto svolge un ruolo nella regolazione della proliferazione cellulare, nel differenziamento e nell'apoptosi.

È stato osservato che un supplemento di Selenio dalla dieta possa svolgere un ruolo preventivo nella riduzione del rischio di sviluppo del cancro della mammella.

Sono stati proposti diversi potenziali meccanismi chemio preventivi:

- stimolazione di apoptosi
- induzione dell'arresto del ciclo cellulare
- inibizione delle cellule tumorali
- modulazione dell'espressione genica dei recettori ormonali (*Sheng Zhang et al. 2013*).

Diversi studi hanno dimostrato che il selenio è uno strumento efficace per scongiurare vari tipi di cancro, compreso il cancro al seno.

Oggi, la ricerca mostra che, il selenio soprattutto quando usato in combinazione con la vitamina C, vitamina E beta-carotene, lavora per bloccare le reazioni chimiche che generano radicali liberi nel corpo che possono danneggiare il DNA e causare cambiamenti degenerativi nelle cellule, portando al cancro.

Il selenio agisce per impedire che i tumori si sviluppino e contribuisce alla morte delle cellule cancerose e pre-cancerose. Esso causa la loro morte prima che possano replicarsi, contribuendo in tal modo a bloccare il cancro prima che si sviluppi.

Ci sono diversi meccanismi possibili per l'effetto protettivo del selenio.

Il Selenio svolge la sua azione antitumorale mediante delle selenoproteine, tra queste:

- la Glutazione perossidasi che è stata la prima selenoproteina scoperta, e la forte correlazione osservata tra la concentrazione di selenio negli eritrociti e l'attività dell'enzima glutazione perossidasi(GSPHx), ha fornito il primo marcatore biochimico funzionale dello stato del selenio. GSPHx è presente nel citosol, dove agisce come antiossidante attraverso la riduzione diretta del perossido di idrogeno (H₂O₂) ad acqua ed alcoli ed è selenio-dipendente, associata al rischio di sviluppo del cancro al seno.
- Selenio binding-protein (SBP1): è presente in basse concentrazioni nelle varie tipologie di cancro rispetto a quelle dei tessuti normali. Bassi livelli di SBP sono associati a cattiva prognosi (*Wenfeng F. et al 2010*).

Da numerosi studi condotti in vitro su linee cellulari MCF-10A e ritrovabili in letteratura scientifica, si evince che il selenio svolge un'azione preventiva inibendo la crescita cellulare e la trasformazione in cellule neoplastiche riducendo l'incidenza del carcinoma mammario in seguito ad esposizione ad agenti cancerogeni.

Poiché gli estrogeni svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo e il differenziamento dei tessuti bersaglio, il presente studio viene analizzato per esaminare l'effetto del selenio sull'espressione e attivazione del recettore per gli estrogeni (ER), utilizzando l'acido metil-selenico (MSA) come forma attiva del selenio in vitro; valutando la sua azione sulla linea cellulare MCF-7 (*SOO OK Lee et al. 2005*).

Sembrirebbe che il selenio diminuisca i livelli di espressione di ER α , proteine e riduca i legami con ER in cellule MCF-7; in particolare a livello di questa linea cellulare determina l'inibizione dell'attività trans-attivante di ER.

Inoltre, il selenio inibisce la crescita di due linee cellulari precancerose del cancro al seno, bloccando la progressione del ciclo cellulare in fase G₀-G₁ e induce la morte per apoptosi.

L'acido metil-selenico(MSA) viene utilizzato specificatamente per gli studi in vitro, dal momento che le cellule in coltura rispondono male alla seleniometionina e si evince che svolga un'azione inibitoria sulla crescita cellulare. Nel medesimo studio è stato dimostrato che dosi farmacologiche di selenio provocano l'arresto del ciclo cellulare in G₁, inducono l'apoptosi, modulano le molecole di segnalazione cellulare che comportano la riduzione delle dimensioni delle lesioni intra duttali papillari nel tumore mammario. Oltre a indurre apoptosi ed inibire la proliferazione cellulare, altri meccanismi dell'attività antitumorale del selenio includono la soppressione dell'attività angiogenetica e la modulazione dello stress ossidativo.

Dal momento che gli estrogeni esercitano la loro azione proliferativa sulle cellule della mammella stimolando la progressione del ciclo cellulare e proteggendo le cellule da morte per apoptosi; è possibile che il selenio svolga la sua azione antitumorale interrompendo la via di segnalazione di ER in cellule di carcinoma mammario ER positive.

Dosi farmacologiche di selenio sembrerebbero svolgere un'azione chemio preventiva sulla carcinogenesi mammaria.

Studi casi-controllo hanno infatti rilevato l'importante associazione che vi è tra i livelli plasmatici di selenio e l'assunzione di selenio con la dieta ed il rischio di sviluppare carcinoma della mammella, per la costruzione di importanti strategie chemio preventive.

Capitolo 4

TRATTAMENTO TERAPEUTICO PER IL CARCINOMA MAMMARIO ORMONO-RESPONSIVO

Distinguere i vari tipi di neoplasia della mammella può esser utile nel determinare il miglior approccio terapeutico. Il carcinoma duttale e il carcinoma lobulare sono i più comuni. Come dice il nome, colpiscono rispettivamente le cellule duttali e le ghiandole deputate alla produzione di latte. In entrambi i casi la neoplasia può rimanere localizzata (carcinoma in situ) oppure estendersi al di fuori del sito originario del tumore e metastatizzare in altre parti del corpo attraverso il sangue o il sistema linfatico (cancro alla mammella invasivo) (Fig.8).

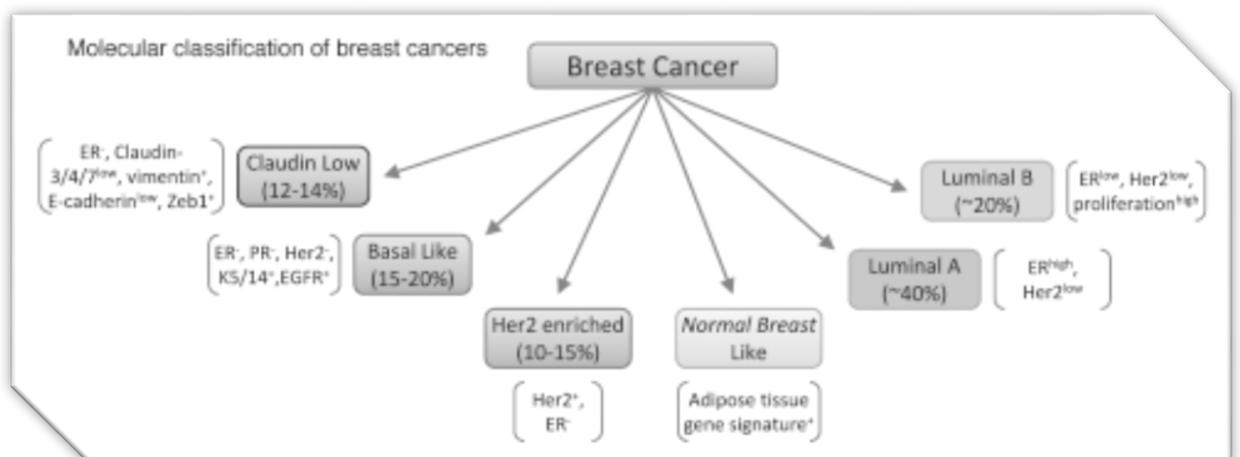


Fig.8 Histological classification of breast cancer subtypes (Glutam K.M et al, 2010).

Esistono altre forme che originano dal tessuto connettivo fibroso, capezzolo, areola.

In alcuni casi non hanno origine all'interno della mammella ma sono metastasi di neoplasie con sede in altre parti del corpo, come ad esempio colon, polmoni, linfoma non-Hodgkin, melanoma.

Una buona classificazione deve tener conto dello stato dei recettori ormonali, in particolare quelli per gli estrogeni e progesterone. Il recettore è una struttura proteica situata sulla parte extracellulare di una cellula bersaglio, che legandosi in modo specifico ad un ligando, media una risposta biologica. Le cellule normali della mammella ed alcune cellule di carcinoma mammario possiedono i recettori per gli ormoni femminili. Gli ormoni mandano segnali alle cellule affinché venga aumentata la crescita cellulare.

Il cancro che presenta questi recettori è definito ormono-responsivo ed in particolare può esser ER+ (recettore positivo per l'estrogeno) oppure PR+ (recettore positivo per il progesterone). Nel suo trattamento sono usati farmaci bloccanti gli ormoni (tamoxifene) in modo da rallentare la progressione del tumore. Il cancro non ormono-responsivo non può invece avvalersi della terapia ormonale in quanto i recettori ormonali non sono presenti.

Conoscere se nelle cellule neoplastiche è presente una over espressione del gene HER2 può infine esser un'informazione utile ai fini della classificazione e del trattamento.

Casi di HER2 negativo, ER- e PR- sono definiti tripli negativi e la neoplasia tende ad esser più aggressiva.

4.1 Classificazione molecolare del carcinoma mammario

I carcinomi mammari rappresentano un gruppo molto eterogeneo di neoplasie dal punto di vista morfologico, prognostico e di risposta alla terapia. Recentemente la spiccata eterogeneità del carcinoma mammario è stata confermata dallo studio del profilo dell'espressione genica che ha rivelato come ogni singolo carcinoma mammario ha un suo preciso ed unico assetto molecolare (*Perou CM et al,2000; Sorlie et al,2006; Schnitt et al. 2010; Goldrhrisch et al.2011*). Nonostante questa grande variabilità, le neoplasie della mammella si possono ricondurre a cinque principali categorie (*Fig. 9*).

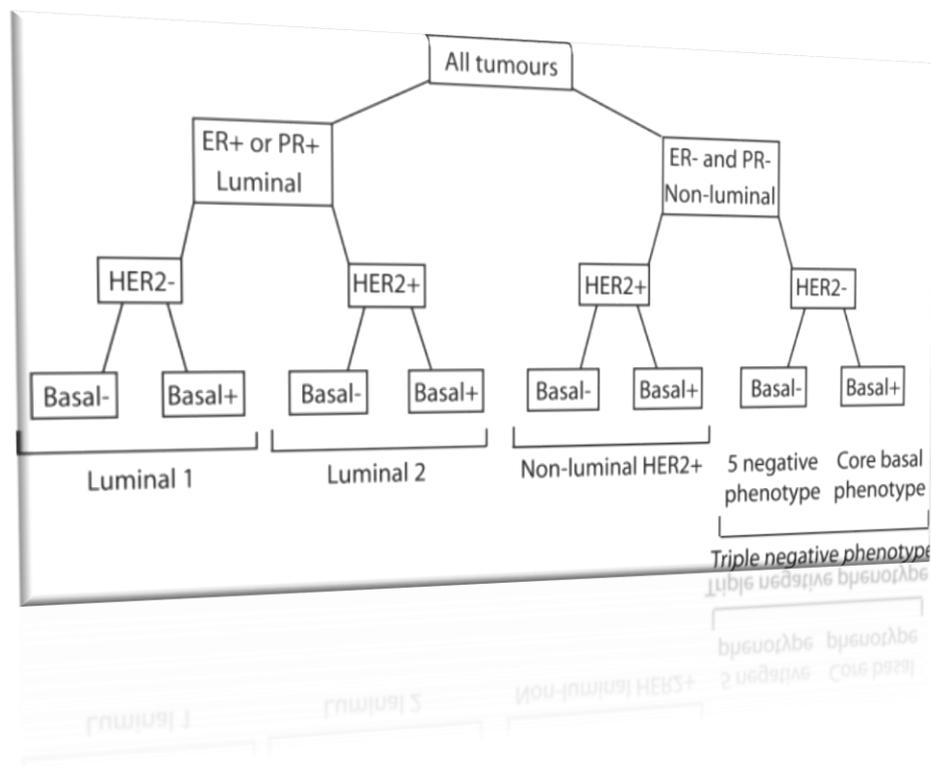


Fig.9 Classification of breast cancer subtypes according to IHC marker profile (Fiona M.B et al, 2010).

Questi sottotipi riflettono i pattern di espressione genica dei due tipi principali di cellule della mammella adulta:

- le *cellule luminali*: disposte in un unico strato verso il lume dei lobuli,
- le *cellule mioepiteliali*: poste all'esterno a circondare le luminali e che poggiano direttamente sulla membrana basale (Perou CM, 2011).

I carcinomi luminali sono così definiti per l'espressione di citochine luminali ; sono ER positivi e rappresentano circa il 70% dei carcinomi invasivi della mammella.

I carcinomi luminali possono essere distinti in due sottogruppi rispettivamente:

- *luminal A*: alti livelli di espressione dei recettori estrogenici, bassi livelli di espressione di geni associati alla replicazione, assenza di espressione di HER-2 e basso indice di proliferazione cellulare.
- *luminal B*: bassi livelli di espressione dei recettori estrogenici, alti livelli di espressione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare e iper espressione di *HER2* (Perou CM et al. 2000; Sorlie T et al. 2001; Cheang MCU et al. 2009).

I tumori *HER2* comprendono circa il 10-15% dei carcinomi invasivi; sono rappresentati da neoplasie di alto grado, linfonodo positive, caratterizzate dall'espressione di *HER2* e di altri geni (Sorlie T et al. 2001). Rispondono alla terapia con trastuzumab e pertuzumab e alla chemioterapia con antracicline e taxani (taxolo e taxotere); tuttavia hanno una cattiva prognosi (Hu Z et al. 2006).

I carcinomi *basali* detti anche *basaloidi*, *basal-like*, costituiscono il 10-20% dei carcinomi invasivi della mammella e sono caratterizzati dall'espressione di citocheratine presenti nello strato basale/miopeteliale della ghiandola normale (Maggie CU et al. 2008; Rakha EA et al. 2008; Choo JR et al. 2010).

Frequentemente i carcinomi basali hanno un assetto sovrapponibile ai carcinomi cosiddetti "tripoli negativi" per la perdita di espressione dei recettori estrogenici e progestinici e assenza di iper-espressione di *HER-2*.

Il fenotipo a cellule basali, triplo negativo è caratterizzato da un'alta probabilità di recidive (metastasi polmonari e cerebrali) e da una sopravvivenza totale e libera da malattia significativamente bassa. Il riconoscimento di questo sottogruppo di neoplasie è importante sia per le implicazioni prognostiche che per la loro associazione con i carcinomi eredo familiari.

Altro sottotipo di carcinoma della mammella è rappresentato dai cosiddetti "normal breast", sulla cui reale esistenza ci sono tuttavia ancora dei dubbi. Comprenderebbero il 5-10% di tutti i carcinomi della mammella; esprimono geni caratteristici del tessuto adiposo e presentano una prognosi intermedia fra i luminali ed i basali, non rispondendo alla chemioterapia neo-adiuvante.

La caratterizzazione del fenotipo molecolare comincia ad essere utilizzata per selezionare terapie mirate contro bersagli molecolari (target therapy) come ad esempio per quanto riguarda le indicazioni all'ormonoterapia e alla terapia anti-*HER2* (Goldhirsch A et al. 2011).

4.2 *Trattamento terapeutico del carcinoma mammario*

Avendo oggi a disposizione diversi metodi terapeutici è necessario pianificare un programma di trattamento. La terapia va scelta in base alla dimensione, alla localizzazione del tumore all'interno della mammella, alle metastasi e ai risultati degli esami diagnostici eseguiti. Pertanto le modalità di intervento dipendono in modo stretto dalla stadiazione del tumore.

Stadio: si basa sulla classificazione TNM e con esso intendiamo l'estensione della neoplasia. (*Frederick L. 2007*):

I tipi di trattamento del carcinoma mammario possono essere locali o sistemici.

I primi consistono nell'asportare le cellule cancerose di una determinata zona. La chirurgia e la radioterapia, ad esempio, sono trattamenti locali. Le terapie sistemiche eliminano le cellule cancerose diffuse in tutto l'organismo.

La chemioterapia e l'endocrinoterapia, ad esempio, sono trattamenti sistemici. Può esser utilizzata una sola forma di trattamento o una combinazione di questi, praticati uno alla volta o in successione. L'integrazione di varie forme di trattamento dei tumori è definita terapia integrata o multidisciplinare. In generale possiamo parlare di una terapia finalizzata alla guarigione o palliativa.

- **L'intervento chirurgico:** è la prima linea di trattamento nel caso di tumore della mammella. Il tumore può essere operato in due modalità:
 - chirurgia demolitiva: operazione di asportazione della mammella (o di una consistente porzione di tessuto mammario).
 - chirurgia conservativa: operazione che asporta il tumore ma non l'intera mammella.

Di solito, sono seguite da sedute di radioterapia allo scopo di distruggere ogni cellula cancerosa residua.

- **Radioterapia:** è un tipo di terapia oncologica loco-regionale basata sull'utilizzo di radiazioni ad alta energia nell'ordine dei MeV (raggi X, alfa, beta, gamma), in grado di distruggere le cellule tumorali. Le radiazioni danneggiano il DNA impedendo alla cellula di replicarsi e causandone la morte.

La terapia è diretta specialmente contro le cellule tumorali poiché si replicano più attivamente. Tuttavia alcune cellule normali possono essere uccise, soprattutto quelle ad elevata velocità di replicazione. La radiazione può provenire dall'esterno del corpo mediante l'uso di apposite strumentazioni chiamate acceleratori lineari (LINAC) capaci di generare un fascio di elettroni, raggi X o raggi GAMMA; oppure può provenire da materiali radioattivi collocati direttamente all'interno del tumore (brachiterapia). La radioterapia viene spesso utilizzata in associazione alla chemioterapia, per ridurre la dimensione di un tumore prima della chirurgia o per distruggere eventuali cellule tumorali rimaste dopo un intervento chirurgico. Solo in alcuni casi di tumori localizzati è impiegata come trattamento principale.

- **Chemioterapia:** è una terapia farmacologica sistemica, in grado di distruggere le cellule tumorali con diversi meccanismi d'azione che bloccano la crescita cellulare e la sintesi del DNA.

Un chemioterapico ideale dovrebbe uccidere solo le cellule neoplastiche senza danneggiare le cellule normali. In realtà vengono danneggiate anche le cellule normali in fase di replicazione. L'azione citotossica che ne deriva è proporzionale al tempo di contatto e non alla dose di farmaco somministrata.

I farmaci più usati sono le antracicline (adriamicina, epirubicina), gli agenti alchilanti (ciclofosfamide), antimetaboliti (5-fluoruracile, methotrexate), alcaloidi vegetali (vinorelbina).

Esistono diverse linee di azione della chemioterapia:

- *Chemioterapia adiuvante:* eseguita in aggiunta alla terapia primaria ottenuta con la chirurgia, serve per eliminare le cellule neoplastiche che si sono diffuse dalla sede principale del tumore ad altri distretti all'interno del corpo. Viene impiegata in pazienti nelle quali non è stato possibile evidenziare con i comuni esami strumentali (scintigrafia ossea, RX torace, ecografia) metastasi a distanza, ma la presenza di fattori prognostici sfavorevoli (istologicamente non differenziati, invasione vascolare o linfatica, coinvolgimento del cavo ascellare), fa aumentare la probabilità che queste siano presenti sotto forma di micro metastasi non documentabili quindi con gli esami strumentali.

- *Neo adiuvante*: il trattamento viene effettuato prima dell'intervento chirurgico affinché venga ridotta la massa tumorale e vengano eseguiti interventi meno demolitivi. Terapia di elezione in pazienti con carcinoma mammario localmente avanzato, in cui si cerca di sostituire la mastectomia con un intervento chirurgico conservativo. Oltre alla diminuzione del volume tumorale, la terapia neo adiuvante ha l'obiettivo di eliminare precocemente le micro metastasi occulte (*M. Luisa Brandi, 1997*).
 - *Palliativa*: in questo caso i farmaci chemioterapici vengono impiegati al fine di controllare l'evoluzione del tumore. Viene somministrata per migliorare la qualità di vita del paziente riducendone i sintomi e per ottenere un beneficio in termini di sopravvivenza.
- ***Terapia ormonale***: oggi la terapia ormonale ha assunto un ruolo chiave nella cura di molti tipi di tumore in quanto le conoscenze scientifiche sul ruolo degli ormoni sessuali si sono notevolmente perfezionate nel corso degli anni. Molte cellule tumorali richiedono gli estrogeni per la propria proliferazione. I farmaci impiegati, agiscono interferendo con l'attività di questi ormoni in due modi: impedendo alla cellula tumorale di utilizzare gli ormoni prodotti (farmaci antiestrogeni) oppure inibendo la produzione degli estrogeni stessi (inibitori dell'aromatasi) (*Simona Lambertini, 2004*). Nella terapia ormonale gioca pertanto un ruolo fondamentale l'espressione del recettore per gli estrogeni (ER): maggiore è il contenuto e maggiori sono le possibilità di un successo terapeutico.
- Grazie alle terapie adiuvanti endocrine come ad esempio il tamoxifene, il rischio di recidiva dopo il trattamento chirurgico primario si riduce del 30-35%. Nella malattia metastatica il tasso di risposte obiettive varia dal 30-35% al 65-75%.

Per poter usufruire di questo tipo di terapia è necessario avere una positività per i recettori ormonali, che non tutte le donne con neoplasia mammaria presentano.

4.2.1 Tamoxifene

Fino a poco tempo fa considerato come il trattamento di elezione per il tumore alla mammella.

Si ritiene che agisca come inibitore dell'azione del recettore degli estrogeni nel tessuto mammario. Composto non steroideo, somministrato nelle donne in premenopausa in quanto compete con gli effetti degli estrogeni. In donne ipo estrogeniche possiede una debole azione estrogenica sufficiente a mantenere una buona densità ossea e a prevenire malattie cardiocircolatorie in quanto riduce i livelli di colesterolo circolante. Studi in vitro dimostrano che il tamoxifene agisce a livello del recettore degli estrogeni provocando un'alterazione nella sua conformazione con conseguente danno a livello della trascrizione dell'RNA e riduzione della proliferazione cellulare.

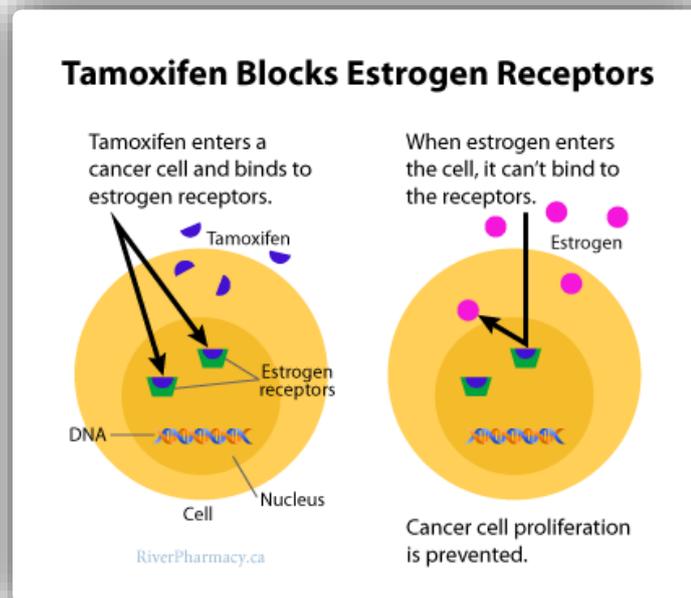


Fig.10 Azione del Tamoxifene sui recettori per gli estrogeni

Il tamoxifene è un inibitore competitivo del legame dell'estradiolo al recettore. Il complesso estradiolo-recettore fisiologicamente controlla l'espressione dei geni regolati degli estrogeni e, in definitiva, la crescita cellulare.

Il tamoxifene riduce la stimolazione autocrina della crescita tumorale e la produzione locale di fattori di crescita, esplicando un'azione citostatica e, a dosi maggiori, un'azione citocida. Le proprietà anti estrogeniche del tamoxifene lo rendono farmaco di scelta sia nel trattamento del carcinoma mammario operato, in terapia adiuvante, che in quello avanzato, con intento palliativo.

4.2.2 5-Fluorouracile

Le fluoropirimidine sono una classe di farmaci antimetaboliti che hanno la caratteristica di impedire la biosintesi dei nucleotidi pirimidinici o di imitarli, interferendo così con la sintesi e il funzionamento degli acidi nucleici. Le fluoropirimidine maggiormente utilizzate nella pratica clinica sono il 5-FU e la capecitabina. Il primo è un analogo dell'uracile da quale differisce per la presenza di un atomo di fluoro al posto dell'idrogeno in posizione 5 dell'anello pirimidinico.

Le fluoropirimidine, specialmente il 5-Fluorouracile (5-FU), sono degli inibitori anti-metabolici di sintesi di nuove purine e pirimidine. La molecola del 5-FU è stata razionalmente progettata sulla base delle conoscenze disponibili sulla biochimica dei tumori. Studi sperimentali avevano infatti dimostrato che alcuni tumori (epatomi del ratto) utilizzavano l'uracile esogeno per la sintesi degli acidi nucleici più attivamente dei tessuti sani. Si pensò quindi di sintetizzare un analogo delle pirimidine, dotato di proprietà chimico-fisiche simili a quelle dell'uracile, che fosse in grado di interferire con la sintesi degli acidi nucleici e di rallentare la crescita del tumore. Il 5-FU gioca un importante ruolo come chemioterapico ed è utilizzato nella clinica oncologica da circa 40 anni. Nella maggioranza dei protocolli standard per un ampio range di tumori solidi come il tumore al seno e il tumore colon-rettale, tumori allo stomaco, al fegato e al pancreas.

Il meccanismo d'azione del 5-Fluorouracile (5-FU) si basa su:

- ✓ incorporazione del FUTP nell'RNA con formazione di un RNA fraudolento;
- ✓ incorporazione di FdUTP, substrato della DNA polimerasi, nel DNA;
- ✓ inibizione della timidilato sintetasi ad opera di FdUMP con conseguente ridotta sintesi di DNA.

Il 5-FU è in grado di indurre una differenziazione nelle cellule tumorali umane, tuttavia è altamente tossico sia per le cellule tumorali che per le cellule normali (Marchal JA. 2000). È un farmaco che agisce in vivo. Il 5-FU viene metabolizzato a livello epatico ed eliminato per via renale. Ha un'emivita molto breve, di alcuni minuti, perciò nella sperimentazione in vitro su cellule MCF-7, si rende necessario ripetere i trattamenti con scadenze regolari (Marchal JA. 2004; Marchal 2007).

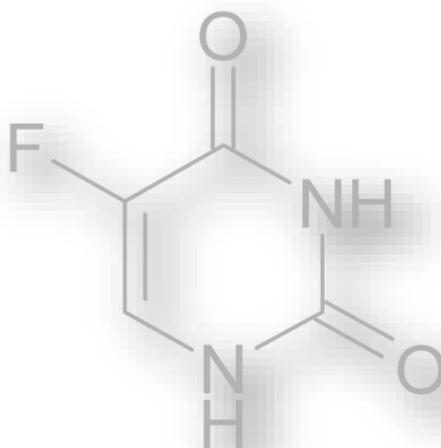


Fig.11 Struttura chimica 5-Fluorouracile

Le indicazioni terapeutiche del 5-FU sono molteplici. È un farmaco ampiamente utilizzato nella pratica clinica in ambito adiuvante e/o palliativo nel trattamento di varie neoplasie maligne.

4.3 Interferenza del cadmio con il 5-Fluorouracile

Come riportato da numerosi studi presenti in letteratura, le cellule trattate con agenti tossici subiscono importanti modifiche nell'organizzazione citoscheletrica (Liu Y.,2010; Madeddu R. 2005;).

Due studi condotti presso il dipartimento di “Scienze biomediche dell'università di Sassari”:

- “*Cadmium influences the 5-fluorouracil cytotoxic effects on breast cancer cells*” (Y. Asara et al, 2012);

- “*Cadmium modifies the cell cycle and apoptotic profiles of human breast cancer cells treated with 5-fluorouracil*” (Yolande Asara et al, 2013);

utilizzarono la tecnica dell'immunofluorescenza per osservare le alterazioni citoscheletriche e correlarle con i risultati dell'espressione genica e proteica sul ciclo cellulare e apoptotico.

Nei seguenti studi sono state eseguite analisi dettagliate per valutare gli effetti deleteri del Cd sull'efficacia della terapia a base di 5-FU.

Sulla base delle relazioni precedenti, è stato stabilito un modello in vitro che riproduce il carcinoma mammario in pazienti trattati con 5-FU esposti al Cd ambientale.

Lo studio delle modificazioni delle proteine del citoscheletro è un parametro particolarmente indicativo del ciclo cellulare e dell'apoptosi.

Sono stati studiati gli effetti del 5-FU su linee cellulari MCF-7 esposte a diverse concentrazioni di Cd; sono state quindi valutate le alterazioni morfologiche e strutturali che ne derivano.

L'obiettivo è stato quello di capire come e quanto il Cd induce modificazioni ultrastrutturali oltre che di espressione genica e proteica, dovute ad interazioni con i recettori per gli estrogeni, nei modelli in vitro.

Poiché il Cd interagisce con il 5-FU, era scopo di questi studi analizzare in che modo le interazioni tra Cd e 5-FU e i processi metabolici della cellula agiscano come cofattori nella patogenesi del tumore mammario, e mettere a punto un protocollo di condizioni sperimentali tali per cui le concentrazioni di Cd e 5FU fossero in grado di rallentare la differenziazione delle neoplasie estrogeno dipendenti come quella del carcinoma mammario.

Successivamente all'allestimento delle colture cellulari MCF-7, quest'ultime sono state trattate con 5-FU e Cloruro di Cadmio con differenti concentrazioni e tempi sperimentali, in parallelo con colture cellulari MCF-7 non trattate utilizzate come controllo.

Nelle cellule trattate con solo Cd sono stati osservati:

- cambiamenti ultrastrutturali con presenza di vacuoli secretivi nel citoplasma (probabilmente lisosomi), prodotte dalle cellule in risposta alle sollecitazioni di Cd;
- rigonfiamento mitocondriale con matrice più densa rispetto alle cellule di controllo.

Nelle cellule trattate con 5-FU sono osservati segnali di degenerazione sia a livello citoplasmatico che nucleare. Il 5-FU agisce ostacolando la crescita cellulare e causando un incremento delle vescicole di secrezione di natura lisosomiale.

Le cellule trattate con la combinazione di Cd e 5-FU non presentano ulteriori alterazioni strutturali ma caratteristiche simili a quelle delle cellule MCF-7 trattate con solo Cd, indipendentemente dalla concentrazione di 5-FU utilizzata.

Questo suggerisce che il Cd svolgerebbe un'azione antagonista sul 5-FU bloccando la sua azione antitumorale.

Alla stessa conclusione si giunge analizzando gli aspetti biomolecolari che mostrano:

- un'aumentata espressione della proteina p53 nelle cellule trattate con solo Cd rispetto a quelle trattate con 5-FU.
Tale espressione diminuisce nelle cellule MCF-7 trattate con una combinazione di Cd e 5-FU.
- l'aggiunta di Cd alle colture pre trattate con 5-FU induce un incremento dell'effetto anti-apoptotico del gene Bcl-2, gene che in seguito all'aggiunta di Cd determinerebbe un arresto dell'azione antitumorale di 5-FU con conseguente proliferazione cellulare osservabile in microscopia.

I risultati suggeriscono che l'efficacia del 5-FU può essere ridotta in pazienti con cancro al seno che sono già stati esposti a Cd; quindi il Cd svolgerebbe un ruolo inibitore sull'efficacia del 5-FU.

L'esposizione cronica al Cd rappresenta un fattore di rischio per lo sviluppo del cancro al seno e deve essere presa in considerazione quando si sceglie il regime chemioterapico. Tali studi dovranno essere considerati come base per eseguire studi futuri, in pazienti con cancro al seno esposti cronicamente al Cd ambientale o al fumo attivo/passivo.

4.4 Selenio: fattore di rischio o agente preventivo?

Il ruolo di Se come potenziale agente chemiopreventivo e chemioterapico è stato sostenuto da studi clinici, epidemiologici e preclinici. I livelli di Se presenti nei capelli e nel sangue sono stati inversamente correlati con i volumi tumorali e sono coerenti con gli effetti anti proliferativi del metallo. Mentre l'apoptosi risulta un'attività antitumorale ben chiara che il Se svolge, sono ancora in fase studio i meccanismi molecolari.

Le proprietà antitumorali del Se potrebbero esser legate a una sua parziale protezione contro lo stress ossidativo. Alcuni studi hanno infatti valutato che, un supplemento di Se in pazienti portatrici di mutazione BRCA1, avrebbe un effetto benefico riducendo i danni ossidativi del DNA.

Uno studio condotto su cellule epiteliali mammarie (MCF10) ha dimostrato che il Se può modificare l'espressione genica. Quando le cellule sono state esposte a concentrazioni di selenito di sodio (Na_2SeO_3) o alti livelli sierici di Se, l'espressione di 560 geni tra cui 60 associati al ciclo cellulare, è stata modificata. Il gruppo di Hawkes et al. descrive che la selenoproteina W (SEPW1) risulta esser l'unica selenoproteina aumentata sia in presenza di selenito di sodio sia di alti livelli sierici di Se (fisiologico). SEPW1 ha determinato l'inibizione della fase G1 e l'aumento dei trascritti genici in quest'ultima riducendo le trascrizioni geniche in fase S, G2 / M. I livelli di SEPW1 erano massimi durante la fase G1, sono scesi dopo la transizione G1 / S e sono nuovamente aumentati dopo la fase G2 / M. (*Florea1 A.M and Busselberg D., 2011*).

Un ulteriore studio ha analizzato il ruolo che la Selenocisteina (Sec), un acido selenoamino naturale, svolge sulle cellule MCF-7. Dallo studio evince che Sec induce un'apoptosi caspasi-indipendente, accompagnata da una scissione ad opera di una poli(ADP-ribosio) polimerasi (PARP) e conseguente attivazione delle caspasi con frammentazione del DNA. Inoltre la Sec induce una perdita di potenziale di membrana mitocondriale (Delta Psi (m)) che coinvolge l'espressione e la fosforilazione di membri della famiglia Bcl-2.

La perdita di Delta Psi (m) induce il rilascio mitocondriale di citocromo C e del fattore che induce l'apoptosi seguita da condensazione della cromatina e frammentazione del DNA. Le cellule MCF-7 esposte a Sec hanno mostrato un aumento di p53 e p53 fosforilata totale.

Inoltre, sono stati riscontrati la generazione di specie reattive dell'ossigeno e l'induzione di rotture del DNA. Pertanto, Sec potrebbe essere un composto antitumorale promettente, che induce apoptosi nelle cellule MCF-7 attivando la fosforilazione ROS mediata.

È stato anche indagato il possibile ruolo che gioca il Se in combinazione ad altri farmaci nella terapia adiuvante.

Li et al. hanno studiato l'effetto terapeutico di metilselenocisteina (MSC) in combinazione con tamoxifene in MCF-7. Infatti, il trattamento con tamoxifene con MSC inibisce la crescita tumorale rispetto al solo MSC o solo tamoxifene. MSC o MSC in combinazione al Tamoxifene ha ridotto significativamente l'espressione di ER α , PR e ciclina D1, l'indice Ki67, e la densità dei microvasi, aumentando l'apoptosi nei tessuti tumorali. Questi risultati dimostrano un'inibizione della crescita sinergica di ER α positivi di cancro al seno per una combinazione di tamoxifene con composti di selenio organico.

Metalli e composti metallici interferiscono con il cancro al seno in più modi. Da un lato, sono un importante fattore di rischio per lo sviluppo del cancro al seno, mentre dall'altro lato la loro citotossicità può avere effetti benefici anche nell'indurre apoptosi e citotossicità in cellule di carcinoma mammario. Per evidenziare questo delicato equilibrio e capire in quali specifiche circostanze le cellule tumorali potrebbero essere bersaglio di metalli e loro composti, sono necessarie ulteriori ricerche.

Discussione

Metalli e composti metallici sono parte del nostro ambiente.

Numerosi metalli sono classificati come "essenziali" per le funzioni fisiologiche che svolgono, se in concentrazioni marginali, quali Zinco (Zn), Ferro (Fe), Manganese (Mn) e altri ancora; altri come "non-essenziali" in quanto non è nota alcuna funzione biologica essenziale e possiedono un potenziale dannoso e tossico per tessuti e organi, se assorbiti in concentrazione elevata.

Tra quest'ultimi si annovera il Cadmio (Cd); è tra i metalli pesanti uno tra quelli ritenuti più tossici per la salute dell'uomo, specialmente per la sua forte associazione con aria e acqua oltre che per la sua importante presenza nel fumo di sigaretta.

L'incremento dell'industrializzazione e dell'attività lavorativa hanno da sempre portato ad un forte uso di sostanze contenenti metalli pesanti, conseguenza di una significativa e considerevole eco-dispersione dannosa per la salute dell'uomo.

Discorso a sé è da fare per il Selenio (Se) che può essere in taluni casi considerato tossico in altri essenziale, in relazione alla sua concentrazione.

Poiché sia un eccessivo che un carente assorbimento possono determinare drammatiche conseguenze, è considerato un elemento a doppia indole.

Infatti è un "microelemento" e come tale presenta un intervallo estremamente ristretto tra soglia di deficienza e tossicità.

Sono quindi influenti ai fini delle potenzialità del danno: la dose del metallo, la durata d'esposizione e la via d'assorbimento.

Ben poche sono le conoscenze disponibili in merito alla gestione di questi elementi da parte dell'organismo, ciò nonostante studi epidemiologici indicano che l'esposizione a lungo termine per composti specifici, indurrebbe diverse forme di cancro tra cui il cancro al seno.

Dopo aver presentato in un'ottica chimica la realtà dei metalli diventa più cruciale descrivere in chiave medica, la patologia del carcinoma mammario che rappresenta la neoplasia più frequente tra la popolazione femminile.

In Italia si stima che ogni anno si registrano circa 300.000 nuovi casi di tumore al seno: a causa di un'incidenza così elevata, che rende questo tumore una malattia con un impatto sociale non trascurabile, e della sua elevata eterogeneità, vi è un forte stimolo mirato all'individuazione di nuovi marcatori da affiancare a quelli già individuati. La causa originaria della neoplasia non è ancora conosciuta con certezza anche se sono identificati fattori di rischio quali fattori genetici, ambientali ed endocrini.

Estrogeno e progesterone influenzano la normale proliferazione, differenziazione e fisiologia cellulare ma possiedono un ruolo primario anche nello sviluppo e nella progressione della neoplasia. Il concetto che gli ormoni possano aumentare l'incidenza di neoplasia è stato approfondito mediante studi sperimentali su estrogeni e neoplasia mammaria condotti su topi e ridefinito poi da studi successivi definendo che, un'iperstimolazione ormonale in assenza di altri iniziatori esterni quali sostanze chimiche o radiazioni ionizzanti, produce negli organi responsivi una proliferazione cellulare che progredisce da normale a iperplastica a neoplastica.

È stato inoltre suggerito che l'alta incidenza nel mondo occidentale di patologie e tumori ormono-dipendenti, quale il cancro al seno, è stata messa in relazione con gli estrogeni presenti nell'ambiente in grado di legarsi ai recettori per gli estrogeni presenti nei tessuti e organi bersaglio ed attivarli.

A tal proposito, un'azione analoga a quella degli estrogeni, sarebbe svolta da alcuni metalli definiti " metalloestrogeni ", cioè metalli in grado di attivare il recettore per gli estrogeni in assenza di estradiolo.

Il cadmio è un metallo al quale sono state attribuite recentemente attività e proprietà estrogeno-simili in virtù delle quali esso agirebbe come " Endocrine disrupter".

Il cadmio probabilmente agisce in tutte le fasi del processo oncogeno, è per questo che molteplici studi presenti in letteratura, hanno utilizzato linee cellulari MCF-7 per valutare gli effetti del trattamento con il Cloruro di Cadmio, sia sulla morfologia che sull'angiogenesi.

All'analisi morfologica si evince che, dopo il trattamento con Cloruro di Cadmio, le cellule mostrano una superficie liscia con scarse o assenti vescicole di secrezione, caratteristiche invece delle cellule di controllo; il saggio angiogenetico mostra una risposta significativamente meno intensa rispetto alle cellule di controllo non trattate.

Si denota quindi, che l'esposizione cellulare a concentrazioni non tossiche di Cloruro di Cadmio determina una riduzione sia nell'attività secretoria sia nel potenziale angiogenetico. Ulteriori studi sono stati eseguiti su linee cellulari MCF-10A, spesso utilizzate come controllo normale in studi sul cancro al seno in quanto negative per i recettori degli estrogeni (ER).

È stata quindi valutata la capacità dell'esposizione a bassi livelli di cadmio di indurre la trasformazione della linea cellulare MCF-10A da ER-negativo a fenotipo maligno.

La trasformazione diretta di cellule epiteliali mammarie in fenotipo maligno indotta dal cadmio, sostiene con forza i dati epidemiologici emergenti che supportano il ruolo del cadmio nel processo di carcinogenesi mammaria.

Diversamente da quanto affermato fin d'ora sulle proprietà cancerogene del cadmio, Schwarz e Foltz scoprirono il ruolo preventivo del Selenio. Da allora si sono succedute numerose ricerche per svelare tutte le implicazioni a breve e lungo termine del Selenio nella salute umana.

Sheng Zhang e collaboratori proposero diversi potenziali meccanismi chemio preventivi quali la stimolazione dell'apoptosi, l'induzione dell'arresto del ciclo cellulare, l'inibizione delle cellule tumorali e la modulazione dell'espressione genica dei recettori ormonali.

Poiché gli estrogeni svolgono un ruolo fondamentale nello sviluppo e nel differenziamento dei tessuti bersaglio, lo studio condotto sulla linea cellulare MCF-7 con l'uso di acido metil-selenico (MSA) come forma attiva del selenio in vitro, ha lo scopo di valutare la sua azione sulle cellule epiteliali mammarie. Da questo studio si desume l'azione inibitoria del Selenio sulla crescita cellulare, inoltre dosi farmaceutiche indurrebbero l'apoptosi oltre che la soppressione dell'attività angiogenetica e la modulazione dello stress ossidativo.

Da studi caso-controllo si evidenzia l'importante associazione tra i livelli plasmatici di selenio e l'assunzione con la dieta e il rischio di sviluppare il carcinoma, atti alla costruzione di strategie chemio preventive.

Distinguere i vari tipi di neoplasia della mammella può esser utile nel determinare il miglior approccio terapeutico.

Diversi sono i trattamenti antitumorali impiegati nel debellare il tumore al seno, sistemici o locali, quali trattamento chirurgico, radioterapia, chemioterapia e ormonoterapia.

Al fine di valutare gli effetti che cadmio e selenio hanno sull'efficacia della terapia, sono stati analizzati studi che hanno come elemento comune lo studio condotto su linee cellulari MCF-7.

Per determinare gli effetti del cadmio sull'efficacia della terapia a base di 5-Fluorouracile (5-FU), due studi condotti presso l'Università di Sassari hanno valutato le alterazioni morfologiche e strutturali oltre che le modificazioni geniche che ne derivano in cellule MCF-7 esposte a solo cadmio, alla combinazione di cadmio + 5-FU e solo 5-FU.

I risultati mostrano che l'efficacia del 5-FU può essere ridotta in pazienti con carcinoma mammario esposti a concentrazioni di cadmio, evidenziando il ruolo inibitore del cadmio sul farmaco.

Argomento d'indagine, in uno studio eseguito da Li e collaboratori, è stato il ruolo del selenio in combinazione con altri farmaci della terapia adiuvante; nello specifico si è valutato l'effetto terapeutico di metilselenocisteina (MSC) in combinazione con Tamoxifene. Il trattamento combinato mostrerebbe l'inibizione della crescita tumorale rispetto alle cellule trattate con solo Tamoxifene o solo MSC.

In conclusione, metalli e composti metallici interferiscono con il cancro al seno. Da un lato sono importanti fattori di rischio per lo sviluppo di carcinoma mammario, dall'altro la loro citotossicità avrebbe effetti benefici con l'induzione dell'apoptosi.

Sulla base di queste considerazioni e dei dati emergenti dagli studi reperibili in letteratura condotti a sostegno dell'associazione degli effetti di specifici metalli nell'indurre il cancro, così come gli effetti dei metallo-derivati utilizzati per le terapie; ulteriori ricerche saranno necessarie per chiarire questo delicato equilibrio.

Bibliografia

- I. **Acquino N.B et al.** "Role of Cadmium and Nickel in Estrogen Receptor Signaling and Breast Cancer: Metalloestrogens or Not?" *Environ Carcinog Ecotoxicol; Rev.* 2012.
- II. **Allred DC. Et al.** "Biological features of human premalignant breast disease". Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
- III. **Antila E. et al.** "Association of cadmium with human breast cancer". *The Science of the Total Environment* 1996.
- IV. **Asara Y. et al** "Cadmium Modifies the Cell Cycle and Apoptotic Profiles of Human Breast Cancer Cells Treated with 5-Fluorouracil". *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 2013.
- V. **Asara Y. Et al.** "Cadmium influences the 5-fluorouracile cytotoxic effects on breast cancer cells." *European Journal of Histochemistry*, vol.56: e1, 2012.
- VI. **Barbareschi M.** "The immunohistochemical detection of steroid hormone receptors in breast cancer: open problems and new perspectives". *Pathologica* , 2002.
- VII. **Bast RC et al.** "American Society of Clinical Oncology Tumor Markers Expert Panel 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology". *J Clin Oncol*, 2001.
- VIII. **Beatson GT.** "On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestion for a new method of treatment with illustrative cases". *Lancet*.
- IX. **Beckmann MW. Et al.** "Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumor heterogeneity". *J. Mol. Med*, 1997.
- X. **Benes S** "The concentration levels of Cd, Pb, Hg, Cu, Zn and Se in blood of the population in relation to the Czech Republic". *Cent. Eur. J. Publ. Health* 8, No. 2, 2000. *The molecular pathology of breast cancer J Pathol*, 2011.
- XI. **Bonsignore A.** *Medicina del lavoro. ECIG*, 2002.
- XII. **Brandi Maria Luisa et al.** "Parathyroid disease" s. *Publicato da SEE Editrice Firenze*; 152-153- 243-304; 1997.
- XIII. **Brown K.M. e Arthur J.R.** "Selenium, selenoproteins and human health: a review". *Public Health Nutrition*, 4, 2001.

- XIV. **Byrne C. et al.** “Cadmium – metallorhormone? *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009.
- XV. **Campbell LL et al.** “Breast tumor heterogeneity. *Cancer stem cells or clonal evolution?*” *Cell Cycle* 6, 2007.
- XVI. **Cheang MCU et al.** “HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer”. *J Natl Cancer Inst* 101, 2009.
- XVII. **Choo JR et al.** “Biomarkers for Basal-like Breast Cancer”. *Cancer* 2, 2010.
- XXVIII. **Clement Ip, et al.** “Chemical Prevention Form of Selenium, Critical Metabolites, and Cancer”. *Cancer Res*;1991.
- XIX. **Crown J et al.** “Emerging target therapies in triple-negative breast cancer”. *Ann Oncol* ,2012.
- XX. **Daniele L et al.** “Anti-HER2 Treatment and Breast Cancer: State of the Art, Recent Patents, and New Strategies. *Recent Patents on Anti-Cancer*”. *Drug Discovery* 4, 2009.
- XXI. **Darmadiblackberry I. et al.** “Selenium in human health.” *Current Therapeutics*, Pp: (2001).
- XXII. **De Pasquale J.** “Rearrangement of the F.Actin cytoskeleton in estradiol-treated MCF-7 breast carcinoma cells”. *Histochem Cell Biol*;1999.
- XXIII. **Ehlers EM and Schubert C.** “Differences in morphology and cytoskeleton of MCF-7 and Mx-1 cells after therapy with OH-Tamoxifen and the pure estrogen antagonist”. ZM 182780. *Annals of Anatomy* 1999.
- XXIV. **Fadare O et al.** “Clinical and pathologic aspects of basal-like breast cancers”. *Nat Clin Prac Oncol*.25, 2008.
- XXV. **Finocchi C. et al.** “Female reproductive steroids and neuronal excitability”. *Neurol Sci, Suppl* 1,2011.
- XXVI. **Fiona M.B.et al.** “Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate a Relationship between Subtype and Short and Long Term Survival”. *Journal of Toxicology*, 2010
- XXVII. **FloreaI A.M. et al.** “Metals and Breast Cancer: Risk Factors or Healing Agents?” *Journal of Toxicology* Volume 2011,
- XXVIII. **Fournier A et al.** “Use of different hormone therapies and risk of histology- and hormone receptor defined invasive breast cancer”. *J Clin Oncol* 26,2008.

- XXIX. **Frederick L. Greene**, *AJCC*. “Atlante per la stadiazione dei tumori maligni. Pubblicato da Springer; .American Joint Committee on Cancer,2007.
- XXX. **Friberg L., et al.** “Cadmium in the environment”, C.R.C. Press.1971.
- XXXI. **Friberg L., et al.** “Cadmium in the environment”, II Ed. C.R.C.Press. 1974.
- XXXII. **Friberg l., et al.** “Handbook on the toxicology of metals”, Elsevier,1979.
- XXXIII. **Fuqua SA et al.** “The biology of estrogen receptors. Disease of the breast”. Lippincot Williams & Wilkins, Filadelfia, 3 edizione 2004.
- XXXIV. **Garcia-Morales P.et al.** “Effects of Cadmium on estrogen receptor of levels and estrogen-induced responses in human breast cancer cells”. *J Biol Chem* 1994.
- XXXV. **Gelmon K et al.** “Targenting triple-negative breast cancer: optimising therapeutic outcomes”. *Ann Oncol*, 2012.
- XXXVI. **Glutam K.M. Et al.** “Histological, molecular and functional subtypes of breast cancer”. *Cancer Biol Ther*,2010.
- XXXVII. **Goldhirsch A et al.** “Stategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus of tre primary therapy of early breast cancer 20112. *Ann of Oncology*, 2011.
- XXXVIII. **Groneberg, DA et al.** “Chronic cough: tobacco smoke, particulate matter, ozone, nitrogen oxides and other environmental factors”. *J Occup Med Toxicol*. 2005.
- XXXIX. **Hu Z et al.** “The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms”. *BMC Genomics*, 2006
- XL. **Hudis CA et al.** “Triple negative breast cancer: an unmet medical need”. *The Oncologist* ,2011.
- XLI. **Hulka B.S. et al.** “Steroid hormones and risk of breast cancer”. *Cancer*, 1994.
- XLII. **Lacroix M.** “Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update”. *Breast Research and Treatment* 2004.
- XLIII. **Lacroix M. et al.** “p53 and breast cancer, an update”. *Endocrine-Related Cancer* 2006.
- XLIV. **Lambertini S.** “Capire il cancro”. Pubblicato da Alpha Test; 2004
- XLV. **Lamia Benbrahim-Tallaa ett al.** “Cadmium Malignantly Transforms Normal Human Breast Epithelial Cell sinto a Basal-like Phenotype”.
- XLVI. **Levenson, AS.** “MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line”. *Cancer Research* 1997.

- XLVII. **Lewis GP et al.** “Contribution of cigarette smoking to cadmium accumulation in man”. *Lancet* 2009.
- XLVIII. **Liu Y et al.** “Role of the cytoskeleton in Cd²⁺-induced death of mouse mesangial cells”. *Can J Physiol Pharmacol* 2010.
- XLIX. **Lonning PE.** “overview of aromatase inhibitors and inactivators in the treatment of advanced breast cancer”. In: *Miller WR, Ingle JR(EDS), Endocrine therapy in breast cancer. Dekker, Basel; 2002.*
- L. **Lumachi F et al.** “I tumori della mammella”. *Unipress Padova,1997.*
- LI. **Madeddu R et al.** “Indirect immunofluorescence study on the cytoskeleton of normal (FG) and neoplastic (SGS/3A) cadmium treated fibroblasts”. *Ital J Anat Embryol* 2005.
- LII. **Maggie CU et al.** “Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype”. *Clin Cancer Res* ,2008.
- LIII. **Mallepell et al.** “Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor α is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006.*
- LIV. **Marchal JA et al.** “Modulation of Myogenic Differentiation in a Human Rhabdomyosarcoma Cell Line by a New Derivative of 5-Fluorouracil”. *Jpn. J. Cancer Res* 2000.
- LV. **Marchal JA et al.** “Growth inhibition, G1-arrest, and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells by novel highly lipophilic 5-fluorouracil derivative” s. *Investigational New Drugs, 2004.*
- LVI. **Perou CM.** “Molecular stratification of triple-negative breast cancer”. *Oncologist* 2011.
- LVII. **Ponce E.** “Chronic Cadmium Exposure Stimulates SDF-1 Expression in an ERA Dependent Manner”. 2013.
- LVIII. **Rakha EA et al.** “Basal-like breast cancer: a critical review”. *J Clin Oncol* , 2008.
- LIX. **Sorlie T et al.** “Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications”. *Proc Natl Acad Sci U S A,2001.*