



UNIVERSITÀ DI PADOVA
Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali

SCUOLA DI DOTTORATO
Territorio, Ambiente, Risorse e Salute (TARS)

INDIRIZZO
Medicina Ambientale: Nutrizione e Inquinamento

CICLO: XXV

TESI DI DOTTORATO

Retrovirus endogeni umani, vaccinazione per la febbre gialla e rischio di cancro

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Mario Aristide Lenzi

Coordinatore d' Indirizzo: Ch.mo Prof. Giovanni Battista Bartolucci

Supervisore: Ch.mo Prof. Giuseppe Mastrangelo

Dottorando: Dr. Luca Cegolon

Alla mia famiglia

Sommario

RIASSUNTO.....	1
ABSTRACT.....	7
GENERALITA' SUGLI STUDI EPIDEMIOLOGICI.....	13
Studio coorte	13
Analisi dei dati di uno studio coorte	23
Studio caso-controllo.....	31
Analisi dei dati di uno studio caso-controllo.....	36
RETROVIRUS ENDOGENI UMANI E CANCRO.....	40
I retro-virus endogeni umani	40
L'espressione di HERV.....	42
La famiglia HERV-K	43
HERV-K e cancro mammario	45
HERV-K e melanoma	46
STUDIO COORTE DI SOGGETTI VACCINATI CON YFV	50
Introduzione	50
Scopi.....	51
Disegno e analisi del presente studio	51
Risultati	59
Discussione dei risultati	61
Conclusioni.....	69
REFERENZE.....	71
TABELLE.....	87
FIGURE.....	97

RIASSUNTO

Introduzione

Precedenti studi hanno dimostrato che la vaccinazione con BCG e/o vaccino antivaiole e/o alcune infezioni gravi riducevano il rischio di melanoma. Una ricerca in un “genome database” ha rivelato che tutti questi agenti infettivi esprimono epitopi con omologia di sequenza amminoacidica con un peptide (denominato HERV-K-MEL), codificato da retrovirus endogeni umani della serie K (HERV-K) e frequentemente espresso nel melanoma. È stato ipotizzato che questi epitopi omologhi siano in grado di generare una popolazione di linfociti T CD8 + cross-reattivi che stimolano una sorveglianza immunitaria verso il melanoma e possibilmente altri tipi di cancro.

Anche il vaccino contro la febbre gialla (YFV) esprime un epitopo con una sequenza amminoacidica strettamente omologa all’antigene HERV-K-MEL. Pertanto è stato condotto uno studio epidemiologico per determinare se questo vaccino conferiva una protezione contro il melanoma. In un precedente studio su una coorte di 28.306 vaccinati è stata evidenziata una riduzione del rischio di melanoma se YFV era somministrato in una fase precoce della cancerogenesi, che precedeva la presentazione clinica del melanoma di 10 anni o più.

HERV-K-MEL è una variante di splicing della proteina dell’involucro (HERV-K-Env). Questa proteina e le varianti di splicing possono agire come antigeni associati al tumore. Metodi immuno-istochimici hanno dimostrato che le proteine HERV-K Env sono espresse in carcinomi mammari umani. In queste pazienti è stata anche dimostrata la presenza di risposte immunitarie cellulari

(cytotoxic T lymphocyte, CTL, con attività specifica anti-HERV-K) e umorali (IgG anti-HERV-K).

Infine, è stato recentemente dimostrato che un anticorpo monoclonale contro HERV-K-Env inibiva la crescita delle cellule del cancro della mammella in vitro, e, nei topi con xenotrapianto di tumore mammario umano, riduceva la massa tumorale in quelli trattati rispetto ai topi di controllo.

In considerazione di quanto sopra, il presente studio si propone di indagare se YFV riduce la probabilità di sviluppare il cancro al seno e melanoma, e di verificare l'andamento temporale dell'associazione dopo vaccinazione con YFV 17D.

Metodi

Lo studio è stato condotto in Veneto, regione del Nord-Est Italia, dove gran parte della regione è coperta dal Registro Tumori del Veneto (VTR).

Il Comitato Etico dell'Università degli Studi di Padova e l'Autorità Nazionale Italiana per la Protezione dei Dati Sensibili hanno autorizzato lo studio.

Secondo la legge italiana, YFV può essere somministrato solo nei servizi sanitari autorizzati e i dati personali dei soggetti vaccinati devono essere registrati. Tutti questi servizi hanno accettato di collaborare. Sono stati esclusi dalla coorte i migranti, i minori di 18 anni, i residenti in Aziende Sanitarie Locali (ULSS) non coperte da VTR, e i soggetti vaccinati dopo la data di diagnosi di cancro.

Il follow-up della coorte è stato condotto mediante record-linkage con i dati del VTR. Nell'analisi statistica è stato considerato solo il primo tumore, escludendo

altri tumori verificatisi in seguito. La massa di persone-anni è stata calcolata prendendo come data entry la data di vaccinazione (se successiva alla copertura VTR) o la data di avvio della copertura VTR (se successiva alla data della vaccinazione). La data di uscita del follow up è il 31 dicembre 2005 (31 dicembre 1999 per l'ULSS 16 di Padova), oppure la data di incidenza del cancro, morte o perdita al follow-up, a seconda di quale fosse stato il primo evento.

L'analisi è stata eseguita mediante la regressione di Poisson. Usando come gruppo di confronto la categoria più bassa è stato stimato il rapporto dei tassi di incidenza (IRR) e l'intervallo di confidenza al 95% (IC) per le seguenti covariate: periodo di calendario (1987-1991, 1992-1996, 1997-2001, 2002-2005), età (classi: 18-29, 30-59, 60 e più anni), e tempo trascorso dalla vaccinazione (TSV) al fine di valutare la relazione tempo-effetto tra YFV e cancro (classi: 0-1.9; 2-3.9; 4-5.9; 6-7.9; 8-9.9; 10-14.9; 15 e più anni di TSV).

Per distinguere l'effetto del gene HERV-K sulla relazione tra YFV e il rischio di cancro è stato anche eseguito uno studio caso-controllo, contrastando i casi di cancro al seno e, separatamente, i casi di melanoma (che per lo più esprimono HERV-K) con un gruppo di controllo composto da pazienti affetti da tutti gli altri tumori (che per lo più non esprimono HERV-K). L'Odds Ratio (OR) per il tumore al seno (o per il melanoma, separatamente) e l'intervallo di confidenza al 95% (IC) sono stati stimati con l'analisi della regressione logistica, in cui la variabile dipendente era 1 per i casi e 0 per i controlli, e le variabili indipendenti erano sesso, età (classi: 18-29, 30-59, 60 + anni), e TSV (classi: 0-1.9; 2-3.9; 4-5.9; 6-7.9; 8-9.9; 10-14.9; 15+ anni dalla vaccinazione).

Risultati.

Il rischio di cancro mammario espresso come IRR nelle classi di TSV si riduceva entro i primi 10 anni dalla vaccinazione, raggiungendo un valore minimo di 0.64 nella classe 4-5.9 anni di TSV, e quindi gradualmente aumentava sino a raggiungere l'unità nella classe 8-9.9 anni di TSV. Nelle classi 10-14.9 e 15 e più anni di TSV l'IRR oscillava restando vicino a 1.00. Nessun IRR raggiungeva la significatività statistica.

Allo studio caso-controllo il rischio di cancro mammario si riduceva nelle classi TSV di 2-3.9 (OR=0.33; p=0.004) e 4-5.9 anni (OR=0.33; p=0.004), quindi aumentava sino a raggiungere un valore massimo di 0.54 dopo 8-10 anni dalla vaccinazione. Nelle classi 10-14.9 e 15 e più anni di TSV, l'OR era sempre inferiore a 1.00. Per quanto riguarda il tumore della mammella, i valori di OR erano sistematicamente più bassi dei valori di IRR in ogni classe di TSV.

L'IRR per il rischio di melanoma raggiungeva il valore minimo nella classe 15 e più anni dalla vaccinazione (IRR=0.50; p=0.407). Allo studio caso controllo gli OR per melanoma raggiungevano il valore più basso nella classe 15 e più anni dalla vaccinazione (OR=0.30; p=0.137). Anche per il melanoma i valori di OR erano più bassi dei valori di IRR in ogni classe di TSV.

Commento dei dati

Coerentemente con le conclusioni di precedenti valutazioni sulla relazione tra altri tipi di vaccinazione e rischio di melanoma, ci si aspettava un modello di

protezione simile per entrambi i tumori, cioè una riduzione del rischio 10 anni dopo la vaccinazione. È infatti biologicamente plausibile che l'effetto protettivo debba essere evidente solo quando YFV è somministrato in una fase precoce della carcinogenesi che precede di molti anni la presentazione clinica del tumore.

Invece, per il tumore mammario sia lo studio caso-controllo e sia lo studio coorte hanno evidenziato un andamento a “U” del rischio di cancro, con protezione massima a 2-6 anni di TSV (come per la maggior parte, se non tutti, i vaccini).

Invece, i risultati dello studio caso-controllo hanno confermato che YFV conferiva un certo grado di protezione verso il melanoma se il vaccino veniva somministrato almeno 10 anni prima della trasformazione maligna.

Sia per il melanoma sia per il tumore mammario, lo studio caso-controllo esprimeva l'effetto protettivo indotto da YFV in maniera più accentuata che lo studio coorte. Pertanto gli OR erano sistematicamente inferiori agli IRR. Questo fatto confermava che l'effetto protettivo di YFV può essere dovuto alla risposta immunitaria indotta da YFV che cross-reagisce con la proteina HERV-K. Se la protezione è un effetto immunitario, ci potrebbero essere due risposte (una risposta umorale ed una risposta cellulare) coesistenti che cross-reagiscono contro gli antigeni HERV-K e YFV. Un meccanismo immunitario umorale (IgG anti-HERV-K) sembra coinvolto nella protezione contro il cancro mammario poiché la risposta è relativamente rapida e tende ad esaurirsi nel lungo periodo. Invece, per quanto riguarda il melanoma, in cui la protezione si osserva dopo più di 10 anni dalla vaccinazione, è più probabile che la risposta sia di tipo cellulare (CTL con attività specifica anti-HERV-K).

Le stime di rischio statisticamente significative riguardavano solo gli OR.

Pertanto i risultati del presente studio vanno interpretati con cautela giacché derivano dall'analisi di uno studio caso-controllo: possono cioè essere utilizzati più che altro per spiegare il meccanismo della protezione dal cancro piuttosto che il grado della stessa nella popolazione generale.

Sembra opportuno confermare questi risultati e replicare lo studio in altre coorti con TSV possibilmente più lunghi. Sembra inoltre opportuno eliminare o almeno attenuare l'effetto di potenziali fattori confondenti come altre vaccinazioni (BCG, vaiolo e altri vaccini raccomandati per viaggi tropicali) e soprattutto il livello socio-economico, che è un fattore rischio riconosciuto per vari tumori fra cui il melanoma e il cancro della mammella.

Se l'associazione negativa tra YFV e tumori esprimenti HERV-K-MEL fosse confermata potrebbero aprirsi nuove possibili strategie per la prevenzione del cancro. Nonostante anti-corpi monoclonali contro antigeni HERV-K Env hanno recentemente dimostrato interessanti prospettive nella terapia del tumore del seno, l'immuno-terapia rimane ancora più complicata e meno vantaggiosa rispetto all'immuno-prevenzione.

ABSTRACT

Introduction

Previous studies have shown that vaccination with BCG and/or smallpox and/or certain serious infections reduced the risk of melanoma. A search in a "genome database" revealed that all these infectious agents express epitopes with homology in the amino acid sequence with a peptide (named HERV-K-MEL), encoded by the human endogenous retrovirus K (HERV-K) and frequently expressed in melanoma. It was suggested that these homologues epitopes are able to generate a population of CD8+ T cells that stimulate a cross-reactive immune surveillance for melanoma and possibly some other types of cancer.

The yellow fever vaccine (YFV) also expresses an epitope with an amino acid sequence closely homologous to HERV-K-MEL. Therefore an epidemiological study was previously conducted to determine if this vaccine confers protection against melanoma. In a cohort of 28,306 vaccinated a reduced risk of melanoma was observed if YFV was administered at an early stage, preceding the clinical presentation of melanoma by 10 years or more.

HERV-K-MEL is a splicing variant of the envelope protein (HERV-K-Env). This protein and the splice variants can act as tumor-associated antigens. Immunohistochemical methods have shown that the HERV-K Env proteins are expressed in human breast carcinomas. In these patients it was also demonstrated the presence of cellular (cytotoxic T lymphocyte, CTL activity with specific anti-HERV-K) and humoral (IgG anti-HERV-K) immune responses.

Finally, it was recently demonstrated that a monoclonal antibody against HERV-K-Env inhibited the growth of breast cancer cells in vitro, and reduced the tumor mass in mice treated with xenografts of human breast cancer, as compared to controls.

In view of the above, the present study aims to find out whether YFV reduced the likelihood of developing breast cancer and melanoma, and to verify the temporal pattern after vaccination with YFV 17D.

Methods

The study was conducted in the Veneto region (Northeastern Italy), where most of the region is covered by the Veneto Cancer Registry (VTR).

The Ethics Committee of the University of Padua and the Italian National Authority for the Protection of Sensitive Data authorized the study.

Under Italian law, YFV can be given only in authorized healthcare services and the personal data of vaccinated subjects must be recorded. All these services have agreed to cooperate. Migrants, minors, residents of Local Health Units (ULSS) not covered by VTR and subjects vaccinated post cancer diagnosis were ruled out.

A record linkage between the vaccinees cohort and the VTR was carried out.

Only the first tumor was considered in the statistical analysis, and further tumors occurring later were excluded. The mass of person-years was calculated by taking data entry as the date of vaccination (if after the coverage VTR) or the date of the start of VTR coverage (if subsequent to the date of vaccination). The end of

follow up was set at 31 December 2005 (31 December 1999 for Padua ULSS 16), or the date of cancer incidence, death or loss to follow-up, whichever was the first event.

The analysis was performed by Poisson regression. Using as comparison group the lowest category the ratio of incidence rates (IRR) and 95% confidence interval (CI) for the following covariates was estimated: calendar period (1987-1991, 1992-1996, 1997-2001, 2002-2005), age (classes: 18-29, 30-59, 60 + years), and time elapsed since vaccination (TSV) in order to assess the time-effect relationship between cancer and YFV (classes: 0-1.9, 2-3.9, 4-5.9, 6-7.9, 8-9.9, 10-14.9, 15-plus years of TSV).

To distinguish the effect of the gene on the relationship between HERV-K, YFV and the risk of cancer, a case-control study was also performed, comparing separately cases of breast cancer and melanoma (mostly expressing HERV-K) with a control group consisting of patients diagnosed with all other tumors (mostly not expressing HERV-K). The odds ratio (OR) for breast cancer (or for melanoma, separately) and the 95% confidence interval (CI) were estimated by logistic regression analysis, where the dependent variable was 1 for cases and 0 for controls, and the independent variables were sex, age (classes: 18-29, 30-59, 60 + years), and TSV (classes: 0-1.9, 2-3.9, 4-5.9; 6-7.9, 8-9.9, 10-14.9, 15 + years after vaccination).

Results

The risk of breast cancer expressed as IRR per classes of TSV was reduced within the first 10 years after vaccination, reaching a minimum value of 0.64 in the class 4-5.9 years of TSV, for then gradually increasing to reach the unity in the class of

8-9.9 years of TSV. In the classes 10-14.9 and 15+ years of TSV the IRR was still close to 1.00. No IRR reached statistical significance.

In the case-control study the breast cancer risk was reduced in the classes 2-3.9 (OR = 0:33, p = 0.004) and 4-5.9 years (OR = 0:33, p = 0.004) of TSV, and then increased to reach a maximum value of 0.54 at 8-10 years after the vaccination. In the classes 10-14.9 and 15 or more years of TSV the OR was always less than 1.00. Concerning breast cancer, the OR values were systematically lower than the values of IRR in each class of TSV.

The IRR for melanoma risk reached the minimum value in the class 15 or more years since the vaccination (IRR = 0:50, p = 0.407). In the case-control study the ORs for melanoma reached the lowest value in the class 15 and more years after vaccination (OR = 0:30, p = 0.137). Even for melanoma the values of OR were systematically lower than the values of IRR in each class of TSV.

Comment of data

Consistently with the findings of previous studies on the relationship between other types of vaccination and risk of melanoma, we expected a similar pattern of protection for both tumors, i.e., a reduction in cancer risk 10 years after vaccination. It is indeed biologically plausible that the protective effect should be noticeable only when YFV is administered at an early stage of carcinogenesis, preceding the clinical presentation of cancer by many years. Breast cancer risk both in the case-control study and the cohort study showed instead a "U" trend for the risk of cancer, with maximum protection at 2-6 years of TSV (as for most, if not all, vaccines). The results of the case-control study instead confirmed that

YFV conferred a degree of protection against melanoma if the vaccine was administered at least 10 years before the malignant transformation.

For both melanoma and breast cancer the case-control study expressed the protective effect induced by YFV in a more pronounced fashion than the cohort study. Therefore, the ORs were systematically lower than the IRRs. This fact confirmed that the protective effect of YFV may be due to the immune response induced by YFV cross-reacting with the HERV-K protein. Assuming an immune effect, there could be two coexisting responses (humoral and cellular) cross-reacting against HERV-K and YFV antigens. A humoral immune mechanism (IgG anti-HERV-K) seems to be involved in the protection against breast cancer because the response is relatively rapid and tends to wane in the long run.

Regarding melanoma, in which protection is observed 10 or more years after the vaccination, the response is more likely to be cellular (CTL specific activity with anti-HERV-K).

The only statistically significant risk estimates were the ORs. Therefore, the results of this study should be interpreted with caution since they derive from the analysis of a case-control study: i.e. they can be rather used to explain the mechanism of protection from cancer rather than its degree in the general population.

It seems appropriate to confirm these results and conduct new studies in other cohorts with possibly longer TSV. It also seems appropriate to eliminate or at least mitigate the effect of potential confounding factors such as other vaccinations (BCG, smallpox and other vaccines recommended for tropical

travels) and especially the socio-economic level, which is a recognized risk factor for various cancers including melanoma and breast cancer.

If the negative association between YFV and tumors expressing HERV-K-MEL was confirmed, new strategies for cancer prevention could be opened. Although monoclonal antibodies against HERV-K Env have recently shown interesting perspectives in the therapy of breast cancer, tumor immuno-therapy is still considered more complicated and less advantageous than immuno-prevention.

GENERALITA' SUGLI STUDI EPIDEMIOLOGICI

Gli studi epidemiologici hanno le loro radici nella sperimentazione scientifica.

Quando è possibile gli studi epidemiologici sono disegnati per ridurre l'effetto di fattori esterni rispetto ai quelli di interesse indagati nello studio. Gli esperimenti epidemiologici includono i clinical trials (su pazienti), i field trials (interventi su membri individuali della comunità) ed i community intervention trials (interventi su intere comunità). Quando il disegno sperimentale non è fattibile si opta per modelli non sperimentali, che consentano comunque di giungere a conclusioni vicine a quelle si sarebbe potuto trarre se l'esperimento fosse stato condotto [Rothman 2008].

Studi non sperimentali (osservazionali) includono:

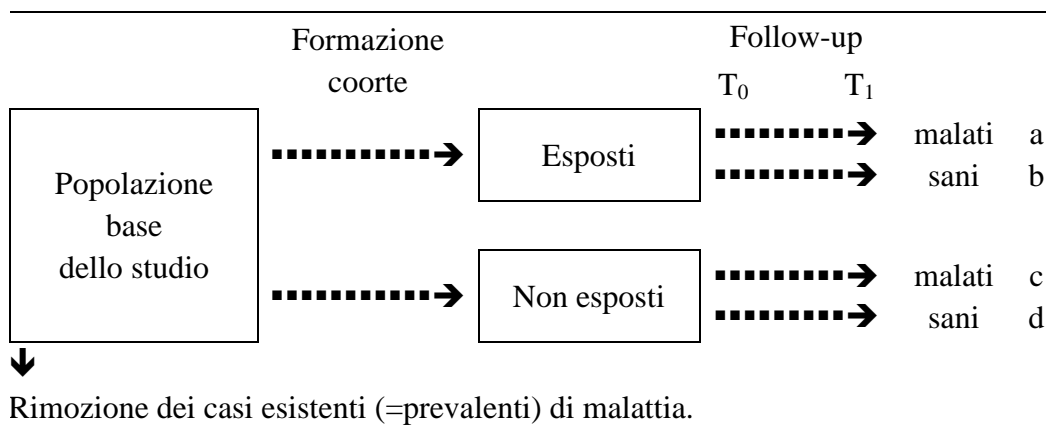
- studi coorte, in cui i soggetti sono classificati in base all'esposizione e seguiti nel tempo per valutare l'incidenza della malattia;
- studi caso-controllo, in cui i soggetti sono selezionati in base al loro stato rispetto alla malattia ed ulteriormente classificati secondo la loro esposizione;
- studi di mortalità proporzionale, che forse andrebbero meglio inclusi fra gli studi caso controllo;
- studi cross-sectional (descrittivi o di prevalenza);
- studi ecologici, ove le unità di osservazione sono gruppi di persone.

Studio coorte

Il disegno a coorte si applica quando l'ipotesi di studio prende la forma:

l'esposizione A causa le malattie $B_1, B_2, \dots B_i$. La coorte è disegnata in modo da includere soggetti con un'esposizione in comune (presente prima dell'eventuale insorgenza di malattia); questa variabile può essere: lo stesso anno di nascita, il gruppo etnico di appartenenza, il livello socio-economico, l'esposizione ad un comune agente, etc.

La coorte (index group) e la popolazione di confronto (reference group) vengono quindi seguite per un determinato periodo di tempo (follow-up) per determinare le incidenze di una o più eventi (variabile di outcome: malattie, decessi, incidenti, etc.) in relazione alle variabili di esposizione (variabili indipendenti). I tassi di incidenza dell'evento di interesse all'interno della coorte vengono di solito confrontati con i tassi della popolazione generale per determinare se vi è un eccesso di rischio dell'outcome nella popolazione in studio rispetto alla popolazione generale. Il confronto si può anche fare fra sottogruppi della coorte classificati in base al livello o al tipo di esposizione (variabili indipendenti).



Gli studi di coorte presentano il vantaggio di includere tutta l'esperienza di una popolazione in studio nel tempo, non solamente un campione di questa. Sono particolarmente indicati quando l'esposizione è rara e la malattia è relativamente frequente

I limiti degli studi coorte sono i seguenti:

Se l'incidenza di malattia è bassa occorre disporre di una notevole massa tempo-persona; ad es. con un'incidenza annua di 5 casi ogni 100.000 persone ($=1/20.000$) si dovranno seguire 2.000 persone per 10 anni per potersi attendere in media 1 caso di malattia, e la probabilità di non osservarne neppure 1 vale $(1-0.00005)^{20.000}=0.37$.

Negli studi di coorte in cui si utilizzano informazioni provenienti da altre fonti, non raccolte ad hoc, difficilmente sono disponibili informazioni relative alle variabili di confondimento modificatori d'effetto (ad es. il fumo); poiché la raccolta di queste informazioni può risultare molto costosa, si può ricorrere ad uno studio caso-controllo innestato sulla coorte.

Spesso la qualità delle informazioni relative alla malattia in oggetto e, soprattutto, dei certificati di morte è scarsa.

Uno studio coorte può essere prospettico (prospective) o retrospettivo (historical o retrospective); in ambedue i casi il valore scientifico dello studio è il medesimo; gli studi di coorte in epidemiologia professionale sono in genere retrospettivi.

Una coorte prospettiva è definita nel presente e i suoi membri sono seguiti nel tempo. Nello studio prospettivo possono essere condotte misure di esposizione

regolarmente e sistematicamente; inoltre possono essere raccolte informazioni su indicatori di morbosità diversi dalle cause di morte, a condizione però che il tempo di latenza della malattia sia breve. Gli studi di coorte prospettici, sebbene teoricamente preferibili per lo studio delle associazioni statistiche, sono raramente usati per lo studio dei tumori o di altre malattie croniche poiché la rarità dell'evento ed i lunghi periodi di latenza richiedono lunghi periodi di follow-up di grandi popolazioni, perciò i costi diventano proibitivi. Sono invece molto utili nello studio di modificazioni funzionali indotte da esposizioni durante periodi ragionevolmente brevi (ad es. 5 anni) [Rothman 2008].

Una coorte retrospettiva è definita in qualche punto o durante qualche periodo di tempo nel passato, per esempio 20 o 30 anni prima. La coorte viene seguita sino al presente; in pratica, ci si arresta 1 o 2 anni prima per permettere che i dati di outcome vengano registrati. Gli studi di coorte retrospettivi sono più adatti allo studio di malattie con bassa incidenza; presentano però alcuni svantaggi: alcuni dati di esposizione necessari alla ricostruzione della storia della coorte possono non essere disponibili o essere incompleti; inoltre sono solitamente studi di mortalità, per il fatto che gli indicatori di morbosità sono raramente disponibili, soprattutto nel passato [Rothman 2008]. Nelle regioni in cui un Registro Tumori dispone delle serie storiche dei casi incidenti di neoplasia è possibile anche uno studio coorte retrospettivo di incidenza dei tumori.

Fonti d'informazione sull'esposizione

L'informazione può essere già disponibile (negli studi coorte storica) oppure viene raccolta ad hoc con interviste o questionari somministrati ai soggetti in

studio o ai loro parenti.

Registri di esposizione genericamente definita sono la sorgente di informazioni negli studi coorte prospettici storici. Questi registri sono, ad esempio, gli archivi del personale gestiti dal datore di lavoro (che contengono: le date di assunzione e di abbandono dell'impiego, i vari lavori esercitati con le loro date e i reparti) e i registri di varie agenzie: ordini professionali di medici, dentisti, pescatori iscritti presso la Capitaneria di porto, agricoltori iscritti presso il Servizio Contributi Agricoli Unificati, ecc.; le liste sindacali di alcune categorie professionali (muratori, spazzacamini, camionisti, ecc.). In Italia la vendita di prodotti tossici (ad es. pesticidi per l'agricoltura) prevede la registrazione dei nomi di chi usa queste sostanze; queste liste possono essere usate per identificare gli esposti. Un censimento è un'operazione condotta periodicamente (dall'ISTAT) per contare l'intera popolazione del Paese. Di solito sono registrati numerosi dati demografici, incluso l'occupazione e il settore industriale, ma questi ultimi sono dati generici e poco attendibili. I dati del censimento, benché alquanto grezzi, possono essere usati per identificare una coorte, di cui poi si valuta la morbosità o la mortalità nei successivi decenni.

Dati e misure di esposizione

La qualità dell'informazione sull'esposizione deve essere altrettanto buona dell'informazione sullo stato di salute. Per ogni soggetto occorre raccogliere le seguenti informazioni [Rothman 2008, Breslow 1987]:

- la qualità dell'esposizione; vi è una sola esposizione o fattore di rischio/protettivo? vi sono rilevanti impurità?

- l'intensità di esposizione, che in epidemiologia qualitativa condiziona la potenza dello studio, e nell'epidemiologia quantitativa consente di costruire la relazione esposizione-risposta;
- la durata dell'esposizione, preferibilmente riferita all'intera vita lavorativa del soggetto;
- il tipo di esposizione, quando si sospetta che picchi di esposizione (e non l'esposizione cronica) possano avere degli effetti;
- i periodi di calendario dell'esposizione in caso di malattia con lunga latenza;
- la natura dei dati di esposizione, cioè su quale tipo di informazione questi dati sono basati, per un giudizio della loro validità e rappresentatività; le diverse sorgenti di informazioni possono essere così ordinate in base alla loro qualità.

Per proteggere la confidenzialità delle informazioni si deve:

- rimuovere il più presto possibile ogni riferimento che possa condurre all'identificazione di una persona;
- utilizzare dati anonimi in tutte le analisi;
- limitare il numero di persone che hanno accesso ai dati;
- nelle indagini con questionario postale, l'indirizzo di ritorno del questionario deve essere una persona, non una istituzione;
- impedire l'accesso ai dati a persone non autorizzate.

Criteri di inclusione e di esclusione dei soggetti

A parte il criterio dell'esposizione, possono essere usati altri criteri per definire

l'eleggibilità e quindi l'inclusione nella coorte [Rothman 2008, Breslow 1987]:

- l'età o il sesso; talune categorie (ad es.: donne, non fumatori) possono essere eliminate dallo studio se il numero di soggetti è scarso (con risparmio di tempo e di risorse economiche per il ricercatore) perché la loro inclusione nello studio darebbe la falsa impressione che le conclusioni siano valide anche per donne, per i non fumatori, ecc;
- un minimo di durata di esposizione, di solito un anno; ciò è giustificato se esiste una dose soglia per l'insorgenza della malattia (ad es. non per i tumori);
- un minimo di intensità di esposizione;
- un periodo minimo di latenza
- assenza di altre contemporanee esposizioni.

Conduzione del follow-up della coorte

Per follow-up si intende l'osservazione di ciascun soggetto reclutato nello studio per tutto il tempo in cui è da considerarsi a rischio (cioè candidato alla malattia) fino al verificarsi di uno degli eventi che ne decretano l'uscita dallo studio [Rothman 2008, Breslow 1987]:

- insorgenza della malattia considerata o morte;
- morte per altra causa;
- insorgenza di malattia antagonista;
- perdita dell'organo bersaglio;
- sviluppo di immunità;

- perdita delle tracce;
- conclusione dello studio stabilita dal ricercatore.

Il processo di follow-up consiste nel rintracciare per ogni individuo informazioni relative a:

- esistenza in vita al termine prestabilito dello studio;
- data di eventuale insorgenza della malattia (nel caso di studi di morbosità);
- data dell'ultima volta in cui il soggetto risulta in vita (nel caso di perso al follow-up);
- data e causa dell'eventuale decesso.

Fonti d'informazione sullo stato vitale

Il follow-up dei soggetti viene condotto collegando (linkage) i dati anagrafici con informazioni sul suo stato vitale, e successivamente di salute, ottenute da vari registri.

1. Registri di popolazione

Ad es. l'anagrafe del comune di residenza. Nei casi in cui questi registri non funzionano o non sono accessibili possono essere usati surrogati, fra i quali: elenco telefonico, agenzie di carte di credito, registri parrocchiali.

2. Archivi di mortalità

Il certificato di morte può essere richiesto al comune in cui è avvenuto il decesso o all'ULSS di appartenenza. I gruppi nosologici principali della causa di morte

sono di solito correttamente registrati, ma il rischio di misclassificazione aumenta se è richiesta una diagnosi più specifica. L'attendibilità degli archivi di mortalità varia da regione a regione e la loro qualità è legata alla frequenza con cui vengono condotte autopsie. Deve essere usata solo la causa di morte principale (o iniziale), e non le altre cause (secondarie, terziarie) che compaiono sul certificato di morte.

3. Archivi di morbosità

L'archivio delle dimissioni ospedaliere (in cui è registrata la diagnosi codificata secondo la International Classification of Diseases (ICD), e i dati anagrafici del soggetto); l'attendibilità delle diagnosi e la qualità del processo di codifica e trascrizione dei dati variano considerevolmente nel tempo e nello spazio;

L'archivio di enti di assicurazione o di istituti che erogano prestazioni economiche in caso di malattia (professionale o non-professionale), che però usano codifiche di malattia diverse dalla ICD;

I registri di patologia, in particolare i registri tumori consentono di identificare gli osservati e fornisce i tassi di incidenza della popolazione generale con cui si calcolano gli attesi.

Tutti i soggetti che entrano nella coorte vi restano indipendentemente dalla fine dell'esposizione o del lavoro e devono essere rintracciati. È importante rintracciare almeno il 97-98% dei soggetti; una percentuale di non rintracciati superiore al 5% può introdurre un bias nei risultati: infatti la probabilità di perdita al follow-up potrebbe essere correlata all'esposizione o al verificarsi dell'effetto [Rothman 2008].

Scelta della popolazione di confronto

Ci sono tre tipi di popolazione di confronto [Rothman 2008]:

- confronto interno: se tra i soggetti reclutati in una certa coorte vi è un numero sufficiente di esposti e non esposti, e i non esposti sono chiaramente identificabili;
- confronto esterno: confronto con la popolazione generale (nazionale o regionale), che si assume non esposta.

Il ricorso alla popolazione generale ha i seguenti vantaggi:

- sono già disponibili i dati di mortalità;
- il tasso stimato nella popolazione generale praticamente non è affetto da errore casuale di campionamento, perciò fornisce allo studio la massima potenza.

Svantaggi:

- bias di selezione;
- l'accuratezza dei dati riguardanti la popolazione è generalmente diversa da quella della coorte esposta;

Il confronto con la popolazione generale permette di evidenziare per quali malattie si riscontra un eccesso nella coorte; successivamente è bene procedere anche a confronti interni (sub-cohort analysis) alla coorte, al fine di ricercare una coerenza interna allo studio (ad es. confronti tra reparti, mansioni, livelli di esposizione, durata di esposizione, ecc.) che ne sostenga la validità.

Analisi dei dati di uno studio coorte

Spesso i confronti tra i tassi di malattia nella coorte e i tassi della popolazione generale sono espressi come Standardized Mortality Ratio (SMR) se l'outcome è la morte o Standardized Incidence Ratio (SIR) se si indagano altri fenomeni (malattia, infortuni, guarigioni, etc.).

Il SIR e l'SMR esprimono il rapporto tra il numero osservato di casi di una certa malattia nella coorte e il numero di casi attesi nella coorte calcolati sulla base dei tassi della popolazione di riferimento.

Il tasso (rate) di incidenza di una malattia/evento misura il numero di nuovi eventi che accadono per individuo per unità di tempo, ed è stimato dividendo il numero totale degli eventi (D) osservati per il numero totale (T) delle persone-anni individuali di osservazione [Rothman 2008, Kirkwood 2003, Armitage 2002, Breslow 1987].

Calcolo degli anni-persona di osservazione

La massa tempo-persona (person-time), di solito anni-persona (person-years), è la somma dei periodi a rischio di ciascun componente della coorte. Si può avere lo stesso valore osservando 2 persone per 10 anni e 20 persone per 1 anno.

La procedura per il conteggio dei tassi aventi gli anni-persona al denominatore è detta modified life table method. Durante il follow-up ogni individuo invecchia e quindi passa nelle classi d'età successive (dette età a rischio, age at risk); anche gli anni-persona vanno calcolati in ogni classe d'età e quindi ogni soggetto contribuisce via via al follow-up di diverse classi d'età. Inoltre i tassi (di

incidenza o di mortalità) all'interno di ogni classe d'età della popolazione variano con l'anno di calendario. Perciò gli anni-persona solitamente vengono calcolati suddividendoli (disaggregandoli) sulla base di queste variabili [Rothman 2008].

Tabella 1A. Calcolo di anni-persona in sette ipotetici operai: dati iniziali per il calcolo

N° soggetto	Inizio di esposizione	Età all'inizio	Commento
①	1944	20	ha lavorato fino al 1973.
②	1944	20	ha lavorato fino al 1949.
③	1944	35	ha lavorato fino al 1973.
④	1944	20	Deceduto nel 1969.
⑤	1972	21	ha lavorato fino al 1973.
⑥	1944	20	dopo 3 sett. lascia; torna dal 1954 al 1956.
⑦	1965	20	ha lavorato fino al 1973.

Tabella 1B. Calcolo di anni-persona in sette ipotetici operai: e attribuzione delle persone-anni alle classi di età e ai periodi di calendario

Classi d'età	Anni di osservazione nelle tre decadi di follow-up			Totale Anni persona
	1944-53	1954-63	1964-73	
20-29	① 10 ② 10 ④ 10 ⑥ 10		⑤ 2 ⑦ 9	51
30-39	③ 5	① 10 ② 10 ④ 10 ⑥ 10		45
40-49	③ 5	③ 5	① 10 ② 10 ④ 6 ⑥ 10	46
50-59		③ 5	③ 5	10
60-69			③ 5	5

Nelle tabelle 1A e 1B viene riportato un esempio (semplificato) di calcolo di anni-persona relativi a 7 ipotetici operai seguiti per la mortalità dal 1944 (data d'inizio del follow-up) al 1973 (data di termine del follow-up).

Gli anni-persona possono essere suddivisi (stratificati) tenendo conto di altre importanti variabili che possono influenzare l'associazione esposizione malattia. Infatti ogni soggetto contribuisce anche al follow-up delle classi di: tempo dall'inizio dell'esposizione; durata di esposizione; e esposizione cumulativa, cui via via il soggetto appartiene.

Per ogni soggetto occorre conoscere le date di: nascita (N), assunzione (A), dimissione (D), morte o insorgenza di malattia (M). Per eseguire i calcoli, conviene trasformare tutte le date in un numero di giorni trascorsi da una data fittizia, ad es. 12/12/1899. Ad esempio:

$$N = 15/5/1906 = 15 + (5-1) \times 30 + (6-1) \times 365 = 1.960 \text{ giorni}$$

$$A = 23/7/1924 = 8598 \text{ giorni}$$

$$D = 21/11/1960 = 21856 \text{ giorni}$$

$$M = 27/6/1979 = 28647 \text{ giorni}$$

$$\text{Età all'assunzione} = (A-N)/365 = 8.2 \text{ anni}$$

$$\text{Durata del follow-up} = (M-A)/365 = 54.9 \text{ anni}$$

$$\text{Durata dell'esposizione} = (D-A)/365 = 36.3 \text{ anni}$$

$$\text{Età di fine esposizione} = (D-N)/365 = 54.5 \text{ anni}$$

$$\text{Età di decesso} = (M-N)/365 = 73.1 \text{ anni}$$

Il soggetto è stato a rischio in tutte le classi d'età e di durata d'esposizione attraverso cui è passato; solo la classe d'età all'assunzione ("15-19 anni") ha da sola il contributo totale in follow-up del soggetto (54.9 anni-persona). Nella tabella 2 sono indicati gli anni-persona con i quali il soggetto, invecchiando e quindi attraversando diverse classi d'età, contribuisce alle varie classi d'età al decesso e di durata dell'esposizione:

Tabella 2. Calcolo di anni-persona di un ipotetici operaio: e attribuzione delle persone-anni alle classi di età e alle classi di durata dell'esposizione

Classi di età al decesso	Classi di durata di esposizione								Totale
	0-4	5-9	10-14	15-19	20-24	25-29	30-34	35-39	
15-19	1.8								1.8
20-24	3.2	1.8							5
25-29		3.2	1.8						5
30-34			3.2	1.8					5
35-39				3.2	1.8				5
40-44					3.2	1.8			5
45-49						3.2	1.8		5
50-54							3.2	1.8	5
55-59								5	5
60-64								5	5
65-69								5	5
70-74								3.1	3.1
Totale	5	5	5	5	5	5	5	19.9	54.9

Gli anni-persona devono essere contati sino al momento nel tempo in cui era noto che la persona era viva, e non fare assunzioni per il periodo successivo; metodi meno raccomandabili sono: considerare queste persone tutte vive o tutte decedute, infatti la prima scelta comporterebbe una diminuzione artificiosa del tasso di mortalità per la coorte, mentre la seconda un aumento [Rothman 2008, Kirkwood 2003, Armitage 2002, Breslow 1987].

Quando si sa che la persona è deceduta ma non si conosce la causa di morte, o perché non si riesce a rintracciarne il certificato o perché si giudica che la diagnosi riportata non sia attendibile, conviene creare una nuova categoria di causa di morte chiamandola "sconosciuta" in cui far cadere questi decessi.

Nella relazione finale dello studio si deve sempre riportare:

- la proporzione di individui persi al follow-up, fra gli esposti e i non esposti;
- quali sono i motivi ipotizzabili delle perdite subite;
- se la completezza ottenuta varia con l'entità dell'esposizione, con le diverse categorie di confondenti (ad es. età, sesso), con la condizione di salute dei soggetti;

Una volta che abbiamo correttamente distribuito il totale degli anni-persona per classi d'età, nelle diverse categorie d'interesse, si ottengono i tassi grezzi dividendo gli osservati di ogni categoria per i corrispondenti anni-persona. Si deve ora procedere alla stima di misure di tassi o di RR standardizzati.

Gli RR possono essere standardizzati in diversi modi; la scelta del tipo di standardizzazione dipende dalla disponibilità dei dati e dal tipo di analisi che si vuole effettuare (analisi di tutta la coorte o analisi per sub-coorti).

Tipo di standardizzazione	Ciò che è necessario conoscere in	
	Gruppo di studio	Gruppo di controllo
Diretta	Osservati specifici Anni-persona specifici	Anni-persona specifici
Indiretta	Osservati totali	Anni-persona specifici Tassi specifici

La questione d'interesse è se esistono differenze tra i tassi delle varie malattie osservati nella coorte in studio e quelli trovati nella popolazione di riferimento, che si suppone non esposta. Ad un primo livello di analisi si esaminano gli SMR o SIR dell'intera coorte lungo tutto il periodo di osservazione per ottenere un quadro generale degli eccessi e dei deficit di malattia (overall SMR analysis on a

cause-specific basis); in questo modo si evidenziano quelle malattie che meriteranno un'indagine più approfondita [Rothman 2008, Kirkwood 2003].

Standardizzazione indiretta:

Classi di età	Popolazione in studio			Pop. di riferimento	
	Casi osservati	Casi attesi	Anni-persona a rischio	Tassi ×1000	
20-24		10 =	2000	×	5
25-29		12 =	2000	×	6
30-34		20 =	2000	×	10
Totali	42	42			

$$SMR = \frac{\text{Osservati}}{\text{Attesi}} = \frac{42}{(2000 \times 5 + 2000 \times 6 + 2000 \times 10)/1000} = \frac{42}{42} = 1$$

Tasso standardizzato = $SMR \times 6/1000 = 6/1000$ anni-persona

Quindi l'incidenza attesa nella popolazione di riferimento, una volta corretta la sua distribuzione per età, risulta uguale a quella della popolazione in studio.

Solitamente il gruppo dei non esposti è una popolazione di riferimento esterna, regionale o nazionale, cosicché i tassi specifici in questa popolazione possono essere considerati stabili e quindi i casi attesi del SIR praticamente delle costanti.

Il numeratore del SIR è il numero totale dei casi osservati nella coorte, mentre il denominatore è ottenuto moltiplicando i tassi strato-specifici della popolazione di riferimento (tassi attesi) per i corrispondenti anni-persona della coorte (ottenendo così i casi attesi) e poi sommandoli attraverso tutti gli strati. Ad esempio un SIR di 2.03 indica che nella coorte c'è un eccesso di malattia del 103% (=SIR x100-100) rispetto alla popolazione di riferimento.

Quando la coorte viene divisa in più sub-coorti, allora il confronto tra i SIR delle sub-coorti non è appropriato perché, se le loro distribuzioni in base al fattore di confondimento sono diverse, i SIR sono stati calcolati usando delle serie diverse di pesi. Come esempio si considerino i dati della tabella seguente:

Età	sub-coorte A				sub-coorte B				T della pop. di riferim. ×1000
	AP	O	A	SMR	AP	O	A	SMR	
<40	1000	25	15	1.67	3000	75	45	1.67	15.0
>40	3000	375	150	2.50	1000	125	50	2.50	50.0
Totale	4000	400	165	2.42	4000	200	95	2.11	

AP = anni-persona; O = osservati; A = attesi; T = tassi

Qui gli SMR delle due sub-coorti A e B sono stati calcolati entrambi sulla base dei tassi della stessa popolazione di riferimento esterna. Possiamo notare che mentre gli SMR specifici per età sono uguali nelle due sub-coorti (1.67 e 2.50 in entrambe), gli SMR complessivi sono diversi (2.42 nella prima e 2.11 nella seconda). Questa discrepanza si spiega con il fatto che la sub-coorte A è formata prevalentemente da soggetti più giovani di quelli della sub-coorte B e che inoltre i tassi nella popolazione di riferimento aumentano con l'età. Quando si hanno più di due strati della variabile di standardizzazione si possono confrontare fra loro gli SMR di ogni strato col test del χ^2 per il trend per vedere se per quel particolare fattore di rischio c'è una tendenza lineare all'aumento o alla diminuzione del rischio [Kirkwood 2003, Armitage 2002].

La distribuzione di Poisson

La distribuzione di Poisson è appropriata per descrivere il numero di volte (D)

che un evento accade durante un intervallo temporale, assumendo che tali eventi siano rari ed succedano in modo random indipendentemente l'uno dall'altro. Tale assunzione si applica con maggiore appropriatezza alle malattie non-comunicabili (come il cancro) rispetto a quelle infettive, a meno che in queste non vi sia forte evidenza che non vi sia alcun effetto cluster.

La distribuzione di Poisson dipende solo da un parametro, il numero medio di eventi (μ) in periodi temporali della stessa lunghezza (o in identiche regioni spaziali). La probabilità che si verifichi l'evento D è:

$$prob(D) = \frac{e^{-\mu} \times \mu^D}{D!}$$

dove:

μ = media del numero degli eventi; e D = numero di volte che accade un evento.

Per evitare il calcolo iterativo dei risultati esatti, l'intervallo di confidenza (superiore= μ_U e inferiore= μ_L) si calcola con un metodo approssimato (approssimazione di Byar), di cui si riportamo le formule [Kirkwood 2003, Breslow 1987]:

$$\mu_L = [D(1 - \frac{1}{9D} - \frac{Z_{\alpha/2}}{3D^{1/2}})^3]$$

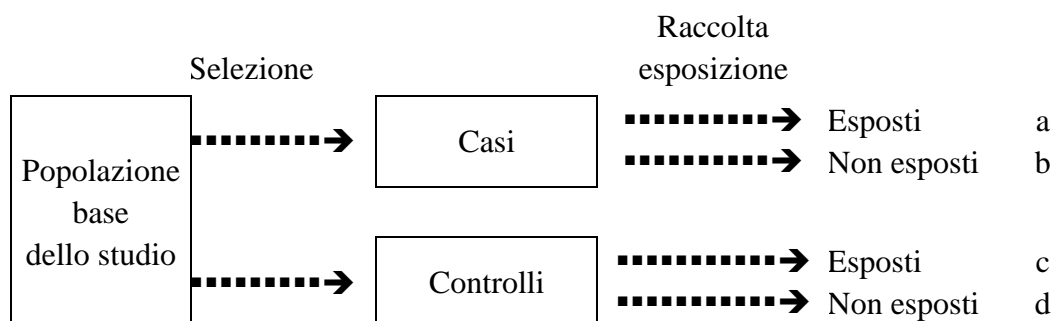
$$\mu_U = [(D+1)(1 - \frac{1}{9(D+1)} + \frac{Z_{\alpha/2}}{3(D+1)^{1/2}})^3]$$

Studio caso-controllo

Il disegno caso-controllo si applica quando l'ipotesi in studio prende la forma: la malattia B è causata dalle esposizioni A1, A2, ... Ai. Tutti (perché di solito la malattia è rara) i soggetti (casi incidenti) che hanno contratto una particolare malattia in una popolazione (base dello studio) e in un certo intervallo di tempo sono raccolti e sono messi a confronto con un campione della stessa popolazione formato da soggetti privi di quella malattia al momento in cui si sono verificati i casi (controlli). Successivamente si ricostruiscono le esposizioni dei soggetti e si confrontano le storie di esposizione dei casi con quelle dei controlli.

Il disegno caso-controllo, rispetto allo studio di coorte, ha costi inferiori in quanto permette di limitare l'accertamento dell'esposizione ai casi e solamente ad un campione della coorte che ha generato i casi.

Normalmente si sceglie un gruppo di casi ed un gruppo di controlli, ma a volte si possono utilizzare più gruppi dai casi da confrontare con un unico gruppo di controlli o un solo gruppo di casi da confrontare con più gruppi di controlli [Rothman 2008].



Indicazioni e limiti

Si studia una sola malattia alla volta, ma permette di studiare simultaneamente l'effetto di vari determinanti e fattori di confondimento. È adatto allo studio di malattie a bassa incidenza, tempo d'induzione lungo e con esposizione relativamente diffusa al fattore considerato; oppure quando la coorte di lavoratori è difficile da enumerare perché distribuita in piccoli luoghi di lavoro dispersi. A parità di potenza, richiede una dimensione minore rispetto agli studi coorte e quindi sono meno costosi. I dati sulla malattia sono in genere raccolti ad hoc, e quindi per il suo accertamento si può adottare il criterio diagnostico giudicato più valido (ad es. accertamento istologico in caso di tumore). Invece non è possibile raggiungere un'analogha accuratezza nell'accertamento dell'esposizione. Gli studi registry-based sono più soggetti a biases rispetto ai cohort-based [Rothman 2008].

Base dello studio

Il principale obiettivo da tenere presente negli studi caso-controllo è quello di selezionare come controlli dei soggetti che rappresentano tutti coloro i quali avrebbero potuto diventare casi nello studio, cioè il gruppo dei controlli deve essere rappresentativo della stessa base dello studio (= insieme delle persone o degli anni-persona) da cui provengono i casi.

La popolazione da cui vengono presi i controlli e i casi da studiare può essere:

Base di popolazione: la popolazione residente in una definita area geografica nell'intervallo di tempo di reclutamento; i casi sono costituiti da tutti i pazienti di nuova diagnosi (ad es. dal registro tumori) o deceduti (ad es. dai registri di mortalità) e i controlli sono costituiti da un campione della stessa

popolazione che ha generato i casi. Ovviamente gli stessi criteri di elegibilità imposti ai casi devono valere anche per i controlli e viceversa. Lo studio risulta più informativo rispetto a quelli su base ospedaliera perché:

- è nota la popolazione sorgente dello studio;
- è direttamente stimabile la proporzione di esposti nella popolazione generale;
- Odds Ratio coincide con il Rate Ratio (se la frazione di campionamento non dipende dal fattore in studio).

Base ospedaliera: la popolazione ospedalizzata in uno o più servizi ospedalieri in un definito intervallo di tempo. I casi sono tutti i pazienti ricoverati presso questi ospedali, e i controlli sono un campione di pazienti ricoverati negli stessi ospedali e nello stesso periodo di tempo, ma per altra patologia. Praticamente si ottiene l'informazione dal 100% dei soggetti reclutati, mentre nello studio di popolazione si può ottenere un rifiuto selettivo da parte dei controlli nel rispondere alle domande circa la pregressa esposizione, con conseguente distorsione della stima. Però negli studi su base ospedaliera non è facile definire la popolazione sorgente dei casi, e quindi assicurare la rappresentatività dei controlli. Si consiglia di ricorrere ad un gruppo di controlli eterogenei per patologia, con ciascuna patologia rappresentata per non più del 10% del totale. I controlli non devono essere affetti da patologie associate positivamente o negativamente con il determinante in studio. Tutte le malattie escluse dal gruppo dei controlli devono essere escluse anche dal gruppo dei casi. D'altra parte, eccedere in esclusioni porta a circoscrivere l'attenzione ad un gruppo troppo selezionato di controlli in cui anche la distribuzione dei confondenti è diversa da quella che si avrebbe in un campione casuale della popolazione d'interesse: la ricerca eccessiva di

confrontabilità tra casi e controlli può portare ad una situazione tanto artificiosa da non permettere la generalizzabilità dei risultati.

Coorte: lo studio caso-controllo innestato entro uno studio di coorte associa la qualità e la completezza dei dati ottenibili con uno studio di dimensione ridotta (caso-controllo) con la qualità dell'informazione circa l'esposizione (non distorta dalla precedente conoscenza dell'insorgenza di malattia) che si ha in uno studio di coorte, e con i pregi di stimabilità e generalizzabilità dei risultati di uno studio su base di popolazione. È importante tentare di rintracciare tutti i casi provenienti dalla coorte, o almeno assicurarsi che i casi abbiano la stessa probabilità di essere individuati indipendentemente dall'esposizione (ad es. i lavoratori maggiormente esposti tendono ad essere più sottoposti a screening) [Rothman 2008, Breslow 1987].

Selezione dei controlli

Si possono usare due strategie di campionamento dei controlli: 1) campionamento per incidenza cumulativa; 2) campionamento per densità d'incidenza.

Campionamento per incidenza cumulativa (cumulative incidence sampling). Se i controlli vengono selezionati tra coloro che sono privi di malattia alla fine del periodo dello studio (cioè: i vivi al termine del follow-up, i persi al follow-up, i morti per altra causa) e se la malattia in studio è rara, allora l'Odds Ratio è una stima del Risk Ratio: la deviazione rispetto al Risk Ratio diventa maggiore del 10% solo quando l'incidenza cumulativa nel periodo dello studio è maggiore del 10%.

Invece, se il campionamento viene fatto tra i soggetti privi di malattia all'inizio dello studio (cioè l'intera coorte), allora l'Odds Ratio è una stima corretta del Risk Ratio senza l'assunzione che la malattia sia rara. Inoltre il campionamento dall'intera coorte offre il vantaggio di poter usare lo stesso insieme di controlli per studiare contemporaneamente diverse malattie. Questo approccio è stato anche chiamato "disegno caso-coorte" (case-cohort design).

Tre aspetti del bias di informazione negli studi caso-controllo:

Recall bias: è collegato al processo del ricordo; generalmente la gente dimentica persino eventi importanti quali un ricovero in ospedale; la dimenticanza di per sé non induce bias, che invece insorge quando i casi ricordano meglio dei controlli la loro esposizione. Se possibile, utilizzare informazioni registrate prima della diagnosi di malattia.

Observer (o interviewer) bias: è legato alla tecnica di raccolta delle informazioni; l'uso di questionari limita l'observer bias; è stato tuttavia osservato che la qualità dell'informazione è migliore con intervista libera piuttosto che con questionari, pertanto il guadagno in termini di simmetria dell'informazione può essere insignificante in confronto alla perdita di qualità. Le persone addette al rilevamento delle informazioni non devono sapere se hanno di fronte un caso o un controllo; inoltre, ogni intervistatore dovrebbe intervistare proporzioni uguali di casi e di controlli; il luogo e le circostanze dell'intervista devono essere simili per i casi ed i controlli.

Esagerazione o falsa informazione: fornita di proposito per conflitti di interesse o richieste di indennizzo [Rothman 2008, Breslow 1987, Kirkwood 2003]..

Analisi dei dati di uno studio caso-controllo

I casi e i controlli sono due serie indipendenti; si fa una tabella per ogni fattore di rischio alla volta:

		Presenza di malattia	
		Sì	No
Esposizione	Sì	Me	Se
	No	Mn	Sn
Totale		Mt	St

Stima di rischio: $OR = \frac{M_e/M_n}{S_e/S_n}$.

Il rapporto degli Odds dell'evento di outcome nel gruppo degli esposti comparato con l'Odds del gruppo dei non esposti (o nel caso di un clinical trial, nel gruppo di trattamento confrontato con il gruppo dei controlli) prende il nome di Odds Ratio (OR). L'OR la misura di scelta per gli studi caso controllo.

$$Odds = \frac{prob(D)}{prob(nonD)} = \frac{prob(D)}{1 - prob(D)}$$

Gli Odds sono stimati in questo modo:

$$Odds = \frac{p}{1-p} = \frac{d/n}{(1-d/n)} = \frac{d/n}{h/n} = \frac{d}{h}$$

Cioè il numero degli individui che vanno incontro all'evento diviso il numero di coloro che non vanno incontro all'evento. L'Odds Ratio (OR) è stimato in questo modo:

$$OR = \frac{Odds(esposti)}{Odds(non - esposti)} = \frac{d_1/h_1}{d_0/h_0} = \frac{d_1/h_0}{d_0/h_1}$$

L'OR è anche conosciuto come il rapporto crociato di una tabella 2 x 2.

Il minimo valore possibile dell'OR è zero, mentre il massimo è infinito. Un'OR di 1 risulta quando gli Odds, e quindi le proporzioni, sono le stesse nei due gruppi ed equivale a non associazione fra esposizione e malattia.

L'OR è sempre più distante del corrispondente risk ratio (RR):

- se $RR > 1$ allora $OR > RR$
- se $RR < 1$ allora $OR < RR$
- per eventi rari (in cui le probabilità che l'evento non accada è vicina a 1) l'OR è approssimativamente uguale all'RR (visto che gli odds si approssimano al rischio). L'OR per la malattia è il reciproco dell'OR per il non evento.

L'OR dell'esposizione, che è l'odds della malattia negli esposti confrontati agli odds nei non esposti, è uguale all'OR della malattia, che è l'odds degli esposti nella malattia confrontato all'odds nei sani.

Gli OR sono in ogni caso la misura di scelta per gli studi caso controllo.

L'intervallo di confidenza al 95% dell'OR si calcola in questo modo:

$$95\% \text{ CI} = OR / ER \text{ to } OR / EF$$

ove

$$EF = \exp [1.96 \times \text{s.e.} (\log OR)]$$

e

$$\text{s.e. (log OR)} = \sqrt{[1/d_1 + 1/h_1 + 1/d_0 + 1/h_0]}$$

Invece OR rappresenta solo un'approssimazione di RR, tanto migliore quanto minore è l'incidenza in:

OR è una misura indiretta del rischio per gli esposti di andar incontro ad una malattia, in confronto al corrispondente rischio dei controlli. OR è una buona stima di RR (o di SMR) solo se valgono entrambe le seguenti condizioni:

La frazione di campionamento (= rapporto tra il n° dei soggetti considerati nello studio ed il n° di soggetti con tali caratteristiche nell'intera popolazione) dei controlli esposti sia uguale a quella dei controlli non-esposti, e quella dei casi esposti uguale a quella dei casi non-esposti. L'uso di controlli ospedalieri non garantisce che questa condizione venga soddisfatta: ad es. il RR di tumore polmonare per i fumatori negli studi che utilizzano controlli ospedalieri risulta minore che negli studi che usano come controllo un campione della popolazione generale; ciò avviene perché il rapporto fumatori/non-fumatori tra i pazienti ricoverati è maggiore del corrispondente rapporto nella popolazione generale (infatti il fumo è causa di ricovero non solo per tumore polmonare, ma anche per tumori in altre sedi, BPCO, malattie cardiocircolatorie, ecc.).

La malattia sia rara (<5%) sia tra gli esposti che tra i non esposti.

Infatti, dette F_M ed F_S le frazioni di campionamento, rispettivamente dei casi e dei controlli:

$$M_e = F_M \times M'_e \quad M_n = F_M \times M'_n \quad S_e = F_S \times S'_e \quad S_n = F_S \times S'_n$$

dove X'_i è il n° di soggetti nell'intera popolazione da cui è stato estratto il campione X_i .

$$\text{Il valore reale di RR é: } RR = \frac{\frac{M'_e}{M'_e + S'_e}}{\frac{M'_n}{M'_n + S'_n}}$$

Se la malattia è rara, M'_e e M'_n sono trascurabili, perciò:

$$RR \approx \frac{M'_e/S'_e}{M'_n/S'_n} = \left(\frac{M_e}{F_M} \times \frac{F_S}{S_e} \right) / \left(\frac{M_n}{F_M} \times \frac{F_S}{S_n} \right) = \frac{M_e}{F_M} \times \frac{F_S}{S_e} \times \frac{F_M}{M_n} \times \frac{S_n}{F_S} = \frac{M_e}{S_e} \times \frac{S_n}{M_n} = \frac{M_e/S_e}{M_n/S_n} = OR$$

Nota che non occorre conoscere i valori di F_M ed F_S poiché si semplificano.

Se la malattia non è rara, allora $RR \neq OR$, ma comunque OR rimane una buona misura di quanto il rischio di malattia differisce nei due gruppi [Kirkwood, Armitage 2002].

RETROVIRUS ENDOGENI UMANI E CANCRO

Il cancro è un problema crescente a livello globale [Wagner 2012, Bray 2012].

Nel Regno Unito per esempio, il 42% degli individui deceduti nel 2008 avevano avuto una diagnosi di neoplasia in precedenza, ed i tumori erano la causa di morte nel 64% di questi pazienti [Maddams 2009].

Il miglioramento della sopravvivenza della specie umana che si è osservato nei precedenti 20 anni è associato ad un marcato aumento del costo medio per il trattamento dei tumori [Ries 2007, Warren 2008]. E' previsto che il costo delle nuove terapie mirate anti-cancro aumenteranno ulteriormente nei prossimi anni [Mariotto 2011], specialmente in paesi sviluppati come gli Stati Uniti, ove la popolazione di età superiore ai 65 anni raddoppierà nel 2030 [US Census Bureau 2008].

Sebbene il miglioramento dei sistemi di notifica e registrazione della malattia, l'aumento della longevità e gli stili di vita giocano sicuramente un ruolo di primo piano nel rischio neoplastico, anche il corretto funzionamento della risposta immunitaria va tenuto in debita considerazione [Krone 2010, Rook 2011]. In tal senso sembra pertanto opportuno investire maggiori risorse in strategie vaccinali protettive verso una gamma di tumori, come avviene già per molte malattie infettive.

I retro-virus endogeni umani

Il genoma umano contiene circa 400.000 loci genici [IHGSC 2001] per circa il 45% è composto o deriva da elementi di natura virale, in esito di pregresse

infezioni da parte di vari tipi di virus [Karazan 2004, Griffiths 2001].

I retrovirus sono un gruppo di virus che utilizza la trascrittasi inversa per convertire il proprio genoma da RNA a DNA durante il proprio ciclo di replicazione. Infezioni delle cellule germinali da parte di retro-virus avvenute milioni di anni fa hanno portato alla stabilizzazione dei retro-virus umani (HERVs) nel genoma umano. L'integrazione degli HERV nella cellula ospite avviene nel contesto del loro ciclo di replicazione [Friedlander 1999, Stoye 2012].

Si stima che gli HERV ammontino a circa l'8% del DNA umano [Bannert 2004, Li 2001] e sono state avanzate due ipotesi per giustificare la loro persistenza in nel genoma durante l'evoluzione. Secondo la teoria parassitica, gli HERVs erano neutrali e loro eliminazione piuttosto complicata [Coffin 1984, Weinberg 1980, Dolittle 1980, Orge 1980, Baltimore 1985]. Per contro, la teoria simbiotica vede gli HERV conservati per selezione positiva, ammesso che la loro funzione fosse rilevante per mantenere certe condizioni vitali [Temin 1992].

In ogni caso, le due teorie non si escludono a vicenda, poiché in seguito alla loro iniziale integrazione successive mutazioni casuali dell'RNA degli HERV hanno condotto alla sintesi di importanti proteine umane, consentendo ai retrovirus di persistere nel DNA umano come simbiotici. Zeyl [1996] ha recentemente esaminato il significato del DNA simbiotico negli eucarioti.

A differenza dei tipici virus, gli HERV non sono infettivi [Bannert 2004, Boller 2008], ma possono essere trasmessi verticalmente come pro-virus in modo mendeliano [Schiavetti 2002]; inoltre, come risultato di multiple mutazioni e

delezioni, gli HERV sono difettivi, perciò non in grado di retro-trasporre.

[Flockerzi 2005].

L'espressione di HERV

Dopo essersi integrati nel DNA ospite, gli HERV producono centinaia di copie di se stessi e possono integrarsi nuovamente lungo il genoma umano. I geni HERV gag, pol, env sono fiancheggiati da sequenze regolatorie chiamate Long Terminal Repeats (LTR), utilizzate dagli HERV per inserire le loro sequenze geniche nel DNA ospite e per regolare sia gli stessi geni retro-virali sia, a volte, anche geni funzionali umani. Gli HERV generalmente diventano non replicativi o per delezione ricombinante fra le due LTR o per mutazione casuale durante la replicazione del DNA del genoma ospite.

Tuttavia, prodotti genici completi ed incompleti possono essere codificati o direttamente da geni HERV env o gag o risultare da meccanismi di ricombinazione [Laufer 2009]. Processi patologici e fisiologici sono influenzati da alcune famiglie attive di HERV direttamente attraverso trascritti virali di RNA o mutazioni generate da retro-trasposizione [Moyes 2007].

Come accennato prima, gli HERV codificano per proteine umane fondamentali e sono significativamente implicati nello sviluppo intra-uterino del feto, oltre che nell'evoluzione della specie umana [Ryan 2009, Gogvadze 2009]. La regione env di tre HERV (HERV-3, HERV-W e HERV-FRD) è cruciale per la formazione del sincizio-trofoblasto placentare, e HERV-FRD sembra inoltre in grado di contribuire ad abbassare il livello della risposta immunitaria verso il feto prevenendone quindi il rigetto [Kalter 1973, Rote 2004].

Gli antigeni HERV sono espressi solo a bassi livelli, ma in particolari circostanze i geni HERV sembrano in grado di iniziare o mantenere processi patologici [Larsson 1998]. Secondo analisi di micro-array, l'espressione degli HERV sembra essere influenzata positivamente dall'esposizione a stimoli esogeni (chimici, raggi UV [Hoenadl 1999, Khan 2001]) o endogeni (citochine, ormoni [Hoenadl 1999, Ono 1987, Katsumata 1999]). Inoltre, fattori ambientali implicati nella modulazione del sistema immunitario [Krone 2005] e l'ipo-metilazione di geni retro-virali di rilievo sembrano essere fattori chiave [Gimenez 2010, Stengel 2010].

La famiglia HERV-K

Gli HERV sono classificati in più di 22 famiglie, a seconda della loro identità di sequenza ed in parte anche alla somiglianza dei loro siti primer di legame per il t-RNA [Bannert 2004, Dolei 2009, Gifford 2003, Belshaw 2000, Tristem 2000].

La serie K è la famiglia retro-virale più recentemente acquisita dalla specie umana, fra i 3 ed i 6 milioni di anni fa [Sverdlov 2000]. Probabilmente proprio per questa loro relativamente recente origine, la famiglia degli HERV-K è la più completa e biologicamente attiva, composta da retro-elementi con integrazione polimorfica nel genoma umano [Bannert 2004, Mayer 1999, Belshaw 2005, Hughes 2005]. L'HERV-K è l'unica famiglia retro-virale che ha mantenuto Open Reading Frames (ORF) intere e funzionanti che codificano per proteine strutturali ed enzimatiche [Bannert 2004, Lower 1993, Muster 2003], e sembrano in grado di indurre la generazione di elementi virali replicanti [Ryan 2009, Mayer 1999, Ono 1986].

L'attivazione degli HERV-K può innescare o mantenere la carcinogenesi (Figura 1). L'espressione degli HERV-K è stata rilevata in diversi tipi di tumori, ed i criteri epidemiologici di Hill sono stati recentemente adattati per valutare l'associazione virus-cancro [Sarid 2011]):

1. Consistenza dell'associazione: trascritti HERV sono stati trovati da diversi studiosi in differenti tipi di tumori: cancro del seno [Schiavetti 2002, Seifarth 1998, Buscher 2005, Contreas-Galido 2008, Wang-Johanning 2012, Wang-Johanning 2008, Wang-Johanning 2003, Wang-Johannign 2001], cancro ovarico [Wang-Johanning 2007], linfoma [Seifarth 1999]; melanoma [Schiavetti 2002], tumori di prostata e vescica [Schiavetti 2002], neoplasie ematologiche [Depil 2002, Boyd 1990], tumori cutanei primitivi e metastasi linfatiche [Muster 2003, Buscher 2005];
2. Forza dell'associazione. Geni HERV sono raramente espressi nei tessuti normali [Schiavetti 2002, Ishida 2008], nei tessuti adiacenti alla mammella [Wang-Johanning 2008] ed in altri tipi di neoplasia [Ahn 2009];
3. Sequenza temporale dell'associazione: Fattori ambientali, sia esogeni (chimici [Khan 2001], raggi UV [Hoenhadl 1999, Schanab 2011, Reiche 2010], fumo [Gabriel 2010], virus [Contreas-Galindo 2007]), ed endogeni (estrogeni [Ono 1987] e citochine [Katsumata 1999]) - facilitano l'espressione degli HERV;
4. Plausibilità biologica. Le proteine degli HERV riducono l'espressione di glutatione perossidasi, aumentando in questo modo i livelli di specie reattive con successivo stress ossidativo [Horsley 2002];
5. Evidenza sperimentale. Vaccinazioni contro il peptide proveniente da un retro-virus endogeno murino ha dimostrato essere in grado di prevenire, sebbene non di curare, il melanoma nel topo [Kershaw 2001];

HERV-K e cancro mammario

Il cancro della mammella è il principale tumore e la seconda causa di morte per cancro tra le donne dei paesi industrializzati [IARC 2008]. Circa il 10% dei tumori alla mammella è attribuibile alla predisposizione genetica [McPherson 2000, Kelsey 1996], e circa il 30% dei casi familiari sono causati da mutazioni dei geni BRCA-1 e BRCA-2 [Hulka 2001].

Studi precedenti hanno suggerito che la protezione contro il cancro al seno è associata all'esposizione precoce ad alcuni virus comuni, mentre l'esposizione nel corso della vita adulta ne aumenterebbe il rischio [Savu 2008].

E' stato riscontrato che linee cellulari e tessuti di tumore della mammella esprimono trascritti HERV-K, a differenza di tessuti sani del seno [McPherson 2000]. Una correlazione significativa tra stimoli estro-progestinici e trascritti HERV-K Env in cellule di carcinoma mammario è stata riportata da diversi autori [Wang-Johanning 2003, Ejthadi 2005, Golan 2008]. In particolare, HERV-K RT è risultata essere espressa in diverse linee di cellule di cancro al seno umano ma non in tessuti mammari umani normali [Golan 2008]. Il ruolo esatto delle proteine HERV-K nella cancerogenesi della mammella è ancora oscuro [Golan 2008], ma trascritti HERV-K Env sembrano contribuire alla proliferazione della neoplasia [Wang-Johanning 2012]. E' stato recentemente riportato che HERV-K env era espressi nel 66% (= 148/223) di una serie di tumori mammari umani, ed erano anche più frequentemente riscontrati in metastasi linfonodali di tumori HERV-K positivi [Wang-Johannign 2012]. Analogamente al melanoma, l'espressione di HERV-K RT e la risposta umorale contro antigeni HERV-K sono

state identificate come fattori prognostici negativi nelle pazienti con malattia [Wang-Johanning 2012, Hahn 2008, Golan 2008].

Anticorpi mono-clonali contro l'antigene HERV-K Env si sono dimostrati capaci di bloccare la proliferazione di cellule di tumore mammario in vitro, e di inibire la crescita tumorale in topi portatori di tumori xeno-trapiantati con tumore mammario umano. In particolare, il trattamento in vitro di cellule di tumore al seno con anti-corpi monoclonali anti-HERV-K Env induceva apoptosi ed attivava la via del segnale di TP53, una proteina soppressore con un ruolo chiave nell'apoptosi [Wang-Johanning 2012].

HERV-K e melanoma

Lo studio caso-controllo multi-centrico FEBIM (FEBrile Infections and Melanoma) ha dimostrato che il bacillo di Calmette Guerin (BCG) e la vaccinazione per anti-vaiolo (entrambi somministrati nella prima infanzia) o malattie infettive acute contratte nel corso della vita erano associate ad un rischio di melanoma inferiore a 1.00 [Koelmel 1992]. Questa evidenza è stata ulteriormente confermata in un altro studio caso-controllo multicentrico condotto su 603 casi incidenti di melanoma maligno e 627 controlli dalla popolazione generale (Tabella 1) [Krone 2003].

Circa l'85% dei melanociti maligni esprimono un antigene chiamato HERV-K-MEL, prodotto di un pseudo-gene incorporato nel gene HERV-K env [Schiavetti 2002]. L'antigene HERV-K-MEL, già precedentemente definito come marker di rischio di melanoma, non è presente in tessuti normali, ma è significativamente espresso nella maggioranza dei nevi displastici, così come in altri tumori quali il

sarcoma, linfoma, cancro di seno e ovaie [Schiavetti 2002].

Una proteina con un'alta omologia di sequenza aminoacidica con l'antigene HERV-K-MEL è espressa dal BCG e dal virus del vaiolo (Tabella 2). Anche il vaccino per il virus della febbre gialla (YFV) sembra esprimere un antigene con una significativa omologia di sequenza aminoacidica con HERV-K-MEL (tabella 2) [Krone 2005, Grange 2009].

La figura 2 mostra la presunta cascata di eventi tra l'espressione di HERV-K e l'inizio della cancerogenesi del melanoma. Grazie al mimetismo molecolare con la proteina reattiva di legame con l'ossigeno (OREBP), i trascritti di HERV-K riducono l'espressione di glutazione perossidasi, aumentando così la tossicità da radicali liberi che comportano un aumento del rischio di cancro [Krone 2005].

Sieri di quattro macachi Rhesus prelevati quattro settimane prima e quattro settimane dopo l'immunizzazione con YFV sono stati incubati con cellule di melanoma provenienti da due pazienti selezionati in modo random. Nella maggior parte delle scimmie è stata osservata reattività immunitaria all'immuno-fluorescenza indiretta dopo la vaccinazione [Hunsmann & Krone 2005].

Vaccination against malignant melanoma. European Patent EP1586330A1].

Questo suggerisce che YFV potrebbe conferire protezione contro il melanoma, attraverso un meccanismo di mimetismo molecolare (Figura 3).

Un'ipotesi alternativa è che l'espressione di HERV-K contribuisce a eludere la sorveglianza immunitaria in topi immuno-competenti, promuovendo in tal modo la crescita e la progressione delle cellule maligne [Singh 2009, Oricchio 2007].

Infatti, l'espressione anormale di HERV-K sembra innescare processi patologici

che portano alla comparsa del melanoma, ma contribuisce anche alle modificazioni morfologiche e funzionali cellulari implicate nel mantenimento e progressione della malattia [Serafino 2009]. Proteine codificate da HERV-K sembrano infatti mediare le fusione inter-cellulare di melanociti maligni, generando così cellule multi-nucleate e portando modificazioni genetiche che comportano vantaggi in termini di crescita e sopravvivenza tumorale [Huang 2013]. Campioni di melanoma primitivo o metastatico e linee cellulari derivate da biopsie di melanoma (ma non lesioni melanocitiche benigne) esprimono antigeni HERV-K come la trascrittasi inversa virale (RT) [Muster 2003, Bucher 2005]. In cellule di melanoma, la down-regulation dell'RNA di HERV-K e l'inibizione farmacologica di RT causavano una ridotta proliferazione, una differenziazione morfologica ed una riprogrammazione dell'espressione genica. Inoltre, la down-regulation degli HERV-K ha causato il rigetto delle cellule di melanoma in topi immuno-competenti [Mangeny 2005] e la diminuzione della capacità cancerogena di cellule di melanoma inoculate in topi nudi [Oricchio 2007]. Al contrario, l'interruzione del trattamento anti-RT produceva risultati inversi, favorendo la progressione della neoplasia e suggerendo quindi un possibile controllo epigenetico da parte di RT [Sciamanna 2005].

Un epitopo immuno-dominante appartenente alla proteina Env è riconosciuto da anticorpi sierici di pazienti con melanoma. La prevalenza di anticorpi contro questo epitopo immuno-dominante è risultata significativamente maggiore nei sieri di 81 pazienti con melanoma affetti da malattia in stadio I-IV (secondo i criteri dell'American Joint Committee on Cancer, AJCC), in confronto al siero di 95 controlli sani [Humer 2006]. In un altro studio gli anticorpi contro i trascritti

HERV-K gag ed env sono stati osservati nel 16% (= 51/312) dei sieri di pazienti affetti da melanoma, ma non in 70 controlli sani [Hahn 2008]. Inoltre, anticorpi specifici verso una proteina trans-membrana codificata da HERV-K env sarebbero stati trovati nel 22% siero di pazienti con melanoma metastatico (N = 60), ma ancora una volta la loro prevalenza nei sieri di 20 donatori sani e pazienti con alopecia era pari a zero [Buscher 2005]. Vi è evidenza che la risposta anticorpale contro le proteine di HERV-K in pazienti affetti da melanoma negli stadi AJCC I-III è associata a minore sopravvivenza, ed è quindi stato proposto come un ulteriore fattore prognostico [Hahn 2008].

Tuttavia, la presentazione di epitopi HERV-K sulla superficie delle cellule appare anche essere il "tallone d'Achille" nelle patologiche legate ad HERV-K [Krone 2010]. Questi epitopi potrebbero infatti essere utilizzati come target per la risposta immunitaria allo scopo di riparare o eliminare le cellule compromesse (Figura 3 e 4). Allo stesso modo dei vaccini antivirali oggi utilizzati per prevenire il cancro del collo dell'utero (anti-HPV vaccino) o il carcinoma epatocellulare (anti-epatite B), vaccini preventivi contro antigeni retro-virali inespressi potrebbero stimolare una risposta linfocitaria CD8+ di lunga durata in un ospite altrimenti vulnerabile, che potrebbe quindi diventare in grado di eradicare neoplasie allo stadio precoce esprimendo questi antigeni retro-virali [Wang-Johanning 2008].

STUDIO COORTE DI SOGGETTI VACCINATI CON YFV

Introduzione

Al fine di valutare il supposto effetto protettivo verso melanoma, è stata arruolata una coorte di 28.306 soggetti vaccinati con YFV nel Veneto, Nord-Est d'Italia [Mastrangelo 2009]. In questo studio, il rapporto tempo-effetto è stato valutato codificando gli anni trascorsi dalla data di vaccinazione alla diagnosi di cancro (o alla fine del follow-up) in una variabile denominata "tempo dalla vaccinazione" (acronimo inglese, TSV), che è stata divisa in tre classi (0-4, 5-9, 10 e più anni). L'effetto di cancro YFV nelle tre classi di TSV è stato stimato con i seguenti metodi epidemiologico-statistici:

- analisi di coorte, calcolando il rapporto di tassi di incidenza di melanoma (IRR, acronimo inglese) e CI con modelli di regressione di Poisson aggiustando per età, sesso e periodo di calendario. In questa analisi il gruppo di confronto è la prima classe TSV;
- un'analisi caso-controllo, in cui i casi di melanoma (che per lo più esprimono HERV-K MEL e Env [Krone 2005, Schiavetti 2002]) sono stati contrastati con un gruppo di controllo composto da pazienti affetti da tutti gli altri tumori combinati (che per lo più non esprimono HERV-K-MEL [Schiavetti 2002]). I dati sono stati sottoposti ad analisi di regressione logistica stimando l'Odds Ratio (OR) con CI. Di nuovo, il gruppo di riferimento era la prima classe di TSV

Le stime di rischio, sempre aggiustati per età e sesso, nelle tre classi di TSV erano

1.33 (intervallo fiduciario al 95%: 0.84–2.11), 1.59 (0.97–2.59) e 0.59 (0.19–1.84) per il SIR; 1.00 (reference), 1.29 (0.64–2.60), e 0.53 (0.15–1.89) per IRR; e 1.00 (reference), 0.96 (0.43-2.14) e 0.26 (0.07-0.96) per OR. Il rischio di melanoma era quindi ridotto se la somministrazione di YFV era avvenuta almeno 10 anni prima della comparsa del melanoma, forse come risultato della prevenzione tumorale anziché dell'eliminazione di cellule di maligne già compromesse. L'unica stima significativa era però l'OR nella classe TSV di dieci e più anni [Mastrangelo 2009].

Scopi

Il presente studio intende rivalutare i risultati precedenti che avevano evidenziato un effetto protettivo del YFV contro il melanoma [Mastrangelo 2009]. Nella stessa coorte sarà inoltre investigato un eventuale effetto protettivo del YFV contro il tumore della mammella, visti i recenti studi sulla immuno-terapia del cancro mammario con anticorpi mono-clonali diretti contro l'antigene HERV-K Env [Wang Johanning 2012].

Disegno e analisi del presente studio

In questo progetto di ricerca è stato eseguito uno studio coorte retrospettivo ed uno studio caso-controllo entro coorte.

Approvazione del Comitato Etico

E' stato innanzitutto necessario redigere un protocollo di ricerca. Questo protocollo è stato inviato e visionato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera di Padova per l'approvazione dello studio e quindi del trattamento dei dati

sensibili. Successivamente tale protocollo è stato sottoposto all'attenzione del Garante della Privacy, che l'ha approvato.

Acquisizione di collaborazioni scientifiche

Sono stati interpellati ed è stata ottenuta la collaborazione scientifica di esperti internazionali immunologi e virologi che avevano già studiato il ruolo protettivo di altre vaccinazioni quali la BCG (vaccino con Bacillo Calmette Guerin contro la tubercolosi) e il Vaccinia Virus (virus Vaccinia di origine bovina contro il vaiolo) rispetto al melanoma. Tale collaborazione e condivisione degli obiettivi di ricerca è stata richiesta al fine di una successiva possibile interpretazione dei risultati dal punto di vista immunologico. I ricercatori che hanno aderito alla richiesta di collaborazione sono stati: Bernard Krone, Department of Virology, University of Goettingen, Germany; John M Grange, London Clinic Cancer Centre, London, UK; Ester de Vries, Department of Public Health, Erasmus Medical Centre, Rotterdam, Netherlands; Klaus Koelmel, Department of Dermatology and Venerology, University of Goettingen, Germany; Paolo Vineis, Imperial College London, School of Public Health, S. Mary's Campus, London, UK; Guido Forni, Human Genome Foundation, Università di Torino, Torino, Italy)

Nel presente progetto sono stati adottati due disegni epidemiologici: studio coorte e studio caso-controllo entro la coorte.

Studio coorte

La legge italiana impone la registrazione delle vaccinazioni effettuate, annotando cognome/nome, data di nascita, residenza del soggetto e data, tipo e lotto di

vaccino somministrato.

La coorte di studio è costituita da soggetti residenti nella Regione Veneto, vaccinati contro la febbre gialla presso i Servizi per le Vaccinazioni Internazionali della regione (SVI) per il rilascio di certificati validi ad uso internazionale, necessari per poter viaggiare all'estero in determinati paesi (DD.MM. 04.02.2002). Nel Veneto gli SVI autorizzati erano 20 nel 2000.

Il disegno dello studio è stato presentato ai Responsabili degli SVI del Veneto nel corso di un convegno tenutosi a Verona nell'aprile del 2005. Sono stati successivamente interpellati tramite lettera solo i Direttori di quegli SVI il cui territorio insiste in Unità Locali Socio-Sanitarie (ULSS) coperte dal Registro Tumori del Veneto (VTR); sono stati esclusi inoltre tre SVI (Adria, Belluno e Dolo) che avevano ottenuto l'autorizzazione per il rilascio dei certificati validi ad uso internazionale dopo il 1999 e gli SVI appartenenti a Unità Sanitarie Locali non coperte dal VTR.

Gli SVI che hanno accettato di fornire i dati ed il cui territorio risulta coperto dal VTR sono i seguenti: ULSS 20 Verona, ULSS 16 di Padova, Ufficio di Sanità Marittima ed Aerea (USMA) di Dolo, ULSS 8 di Montebelluna, ULSS 9 di Treviso, ULSS 5 di Vicenza, ULSS 3 di Bassano del Grappa,. Ha invece rifiutato di partecipare allo studio l'Azienda ULSS 12 Veneziana e lo SVI dell'Ospedale Negrar. Ogni SVI è stato autorizzato alle vaccinazioni in diverse annualità e precisamente: SVI. di Verona nel 1983, SVI di Padova nel 1991, Ufficio Sanità Marittima ed Aerea (USMA) di Dolo nel 1985, SVI di Montebelluna nel 1999, SVI di Treviso nel 1998, SVI di Vicenza nel 1998, SVI di Bassano del Grappa

nel 1999.

Acquisizione degli archivi

Sono stati ottenuti e fotocopiati gli archivi contenenti i soggetti che si sono rivolti agli SVI per ottenere una vaccinazione dall'inizio dell'attività di vaccinazione dello SVI sino al 31 dicembre 2001. I dati relativi a tali soggetti (nome, cognome, sesso e data di nascita, data di YFV, sono stati inseriti in un archivio elettronico inviato al VTR, affinché attraverso un record-linkage identificasse i casi di tumore insorti in questa coorte, ed assegnasse inoltre ad ogni soggetto la ULSS di residenza. L'archivio di tutti i soggetti vaccinati contava inizialmente circa 91.000 soggetti (tabella 3).

Criteri di esclusione

I records ottenuti sono stati successivamente analizzati uno ad uno, eliminando i seguenti soggetti:

- soggetti non linkati dal VTR, quindi non residenti nel Veneto,
- soggetti che, al momento della vaccinazione, avevano meno di 18 anni,
- soggetti stranieri;
- soggetti che risiedevano in ULSS non coperte dal VTR,
- soggetti che erano stati vaccinati dopo il termine del follow-up del VTR nell'ULSS di residenza,
- soggetti con tumori diagnosticati prima della data di vaccinazione (non esposti).

L'archivio così costituito è stato successivamente analizzato per escludere quei soggetti che avessero eseguito più volte la YFV. I soggetti che alla fine sono stati considerati nella coorte di soggetti esposti sono stati 28.306 (Tabella 4).

Follow-up della coorte

Il follow-up della coorte è stato aggiornato dal 31 Dicembre 2001 al 31 Dicembre 2005, per mezzo di record-linkage con i dati dei seguenti archivi:

- dell'Anagrafe Sanitaria Regionale. 401 dei 28,306 soggetti inizialmente presenti nella coorte non sono stati rintracciati; i 27.905 rimanenti sono stati incrociati con i dati del Registro Tumori del Veneto (VTR);
- del VTR, che ha fornito 1,368 casi incidenti di cancro dal 1987 al 2005, includendo anche i tumori multipli, cioè quelli occorsi come seconda, terza o quarta incidenza.

Tuttavia, nell'analisi statistica del presente studio le eventuali successive neoplasie non sono state considerate perché il periodo a rischio terminava in corrispondenza della data di incidenza del primo tumore. Il totale dei tumori è diventato pari a 1,328 casi (830 nello studio originale con follow-up sino al 31/12/2000). Nella presente tesi saranno considerati solo 57 casi di melanoma (37 nello studio iniziale), 187 casi di tumore mammario (71 nel primo studio) e 1,084 tumori di altre sedi.

Analisi statistica

La massa di persone-anni è stata calcolata considerando come data di inizio del follow-up la data di vaccinazione (se era successivo a quello di partenza della

copertura VTR) oppure la data di inizio della copertura VTR (se era posteriore a quella di vaccinazione). La data di uscita è stata il 31 dicembre 2005 (dicembre 1999 per ULSS di Padova), la data di incidenza del cancro, di morte o di perdita al follow-up, a seconda di quale fosse stata la primo.

I dati sono stati analizzati concentrando l'attenzione sull'aspetto temporale dell'associazione fra YFV e cancro della mammella (o tra YFV e melanoma). Tale effetto temporale è stato valutato codificando gli anni trascorsi dalla data di vaccinazione alla data di uscita in una nuova variabile chiamata "Time Since Vaccination" (TSV), categorizzata in intervalli temporali (0-1.9; 2-3.0; 4-5.9; 6-7.9; 8-9.9; 10-14.9; 15 e più anni).

È stata usata la regressione di Poisson per calcolare l'Incidence Rate Ratio (IRR) per il cancro della mammella e per il melanoma, con i relativi intervalli di confidenza al 95%, nelle classi di TSV, aggiustando per sesso, anni di calendario (1987–1991, 1992–1996, 1997–2001, 2002–2005), ed età (0–29, 30–39, 40–49, 50–59, 60–69, 70 e più anni).

Studio caso-controllo entro la coorte

Selezione dei casi e controlli

Nello studio caso-controllo entro coorte sono stati considerati come "casi" i soggetti entro la coorte segnalati dal VTR per aver avuto una diagnosi di tumore mammario o di melanoma. I controlli sono pazienti portatori di altri tumori, diversi da melanoma e cancro mammario. Il criterio per questa scelta è che la generalità di questi tumori non esprime la proteina HERV-K-MEL, che è invece

espressa nelle neoplasie mammarie e nei melanomi [Schiavetti 2002]. Questa proteina non è espressa nei tessuti normali e, dato che questi tumori si comportano come i tessuti normali riguardo all'espressione di HERV-K-MEL, i soggetti affetti da tumori diversi da melanoma e cancro mammario sono stati scelti come controlli.

Secondo Rothman [2008], la scelta dei controlli dovrebbe essere condotta secondo quattro regole fondamentali:

- dovrebbero essere selezionati dalla stessa popolazione che dà origine ai casi; in questo studio i controlli provengono dalla stessa popolazione individuata come popolazione residente in ULSS coperte dal VTR;
- dovrebbero essere selezionati indipendentemente dal loro stato di esposizione; in questo studio i controlli non sono associati all'esposizione perché è ragionevole pensare che l'aver fatto la vaccinazione nei diversi periodi di TSV non sia associato allo sviluppo di tumori diversi dal melanoma e cancro della mammella;
- il tempo durante il quale il soggetto ha la probabilità di venire eletto a controllo dovrebbe essere lo stesso tempo nel quale il soggetto ha una probabilità di diventare caso; in questo studio sono stati selezionati come controlli i soggetti che hanno sviluppato il cancro nello stesso periodo di osservazione dei casi;
- la probabilità di selezione di ogni soggetto tra i controlli dovrebbe essere proporzionale al tempo per cui esso avrebbe contribuito al denominatore del tasso che si sarebbe dovuto calcolare qualora uno studio coorte fosse stato

condotto; in questo studio sono stati selezionati i controlli emersi dagli stessi anni di follow-up di copertura del VTR, inoltre ogni soggetto ha contribuito al follow-up per gli anni in cui ha contribuito a formare il calcolo delle persone anni denominatore del tasso dello studio coorte;

Un altro motivo che giustifica l'inclusione dei tumori nel gruppo di controllo risiede nel fatto che provenendo dalla stessa coorte pazienti affetti da malattie differenti potrebbero essere simili fra loro in termini di background socio-economico, classe sociale ed altri fattori che possono influenzare la somministrazione di YFV. Se due malattie infatti condividono gli stessi fattori di rischio, questo può aumentare potere e specificità dell'associazione [Ashton 2007].

In sintesi si può affermare che la selezione dei controlli tra i soggetti affetti dalle neoplasie indicate, evidenziate dal VTR, ha fornito controlli che hanno avuto origine dalla stessa dimensione spazio-temporale che ha originato i casi. A suffragare questa scelta vi è anche l'opinione di Wacholder [1992], il quale specifica come l'utilizzo di controlli costituiti da soggetti con una malattia (tumore) che si manifesta con le stesse modalità della malattia di interesse (melanoma), potrebbe eliminare una sorgente di selection bias. Se questa malattia con simili manifestazioni non è associata all'esposizione di interesse questi controlli sono da ritenersi ideali. Come negli studi caso-controllo con base di ospedale è imprudente selezionare i controlli da una singola categoria diagnostica, così nel presente studio i controlli sono soggetti con una varietà di diagnosi; in tal modo si ha una attenuazione dell'effetto bias che può verificarsi quando si include una singola specifica categoria diagnostica associata

all'esposizione [Rothman 2008].

Analisi statistica

Tutti i soggetti sono vaccinati e quindi l'esposizione è stata definita come classi di latenza, calcolando il TSV (time since exposure) ossia il tempo trascorso dalla data di vaccinazione alla data di diagnosi. Il TSV è stato suddiviso nelle seguenti classi: 0-1.9; 2-3.9; 4-5.9; 6-7.9; 8-9.9; 10-14.9; 15 e più anni. La classe TSV "0-1.9" è stata considerata come classe "reference" e quindi le è stato assegnato un rischio unitario.

L'Odds Ratio (OR) per cancro alla mammella e melanoma e l'intervallo di confidenza al 95% nelle classi di TSV (considerata come variabile fattoriale) è stato stimato attraverso la regressione logistica, aggiustando per età e sesso. In tale regressione la variabile dipendente è dicotomica (1 per i casi e 0 per i controlli).

L'analisi statistica è stata sempre eseguita utilizzando il pacchetto statistico STATA 12 (Stata Corporation, College Station, Texas, USA).

Risultati

La tabella 5 mostra la distribuzione delle persone anni per classe di età, sesso, e classe di TSV (meno o più di 10 anni). Il totale delle persone anni era 110,660 nelle femmine e 133,338 nei maschi, e 243,998 in entrambi i sessi.

L'invecchiamento della popolazione all'aumentare del TSV spiega il fatto che nella classe TSV maggiore di 10 anni si riducono le persone anni delle classi di età giovanili e aumentano quelle delle classi di età più anziane.

I risultati dell'elaborazione statistica dei dati sono riportati nella tabella 6 e 7 per quanto riguarda il tumore della mammella, e nella tabella 8 e 9 per quanto riguarda il melanoma.

La tabella 6 mostra i risultati dello studio coorte per il tumore alla mammella. Il rischio di cancro mammario nelle classi di TSV è aggiustato per età e periodo di calendario con l'analisi della regressione di Poisson. Entro i 10 anni dalla vaccinazione, il rischio dapprima si riduce, raggiungendo un valore minimo di 0.64 nella classe 4-5.9 anni di TSV, e quindi gradualmente aumenta sino a raggiungere l'unità nella classe 8-9.9 di TSV. Nelle classi 10-14.9 e 15 e più anni trascorsi dalla vaccinazione IRR oscilla restando vicino a 1.00. Nessun IRR raggiunge la significatività statistica.

La tabella 7 mostra i risultati dello studi caso-controllo per il tumore alla mammella. Nelle classi di TSV il rischio di cancro mammario è aggiustato per età e sesso con l'analisi della regressione logistica. Entro i 10 anni dalla vaccinazione il rischio si riduce nelle classi TSV di 2-3.9 (OR=0.33; p=0.004) e 4-5.9 anni (OR=0.33; p=0.004), quindi aumenta sino a raggiungere un valore massimo di 0.54 dopo 8-10 anni dalla vaccinazione. Nelle classi 10-14.9 e 15 e più anni trascorsi dalla vaccinazione, OR è sempre inferiore a 1.00.

Figura 5 mostra l'andamento di IRR e OR per tumore della mammella nelle classi di TSV. I valori di OR sono sistematicamente più bassi dei valori di IRR in ogni classe di TSV.

La tabella 8 mostra i risultati dello studio coorte per il melanoma. Il rischio di melanoma nelle classi di TSV è aggiustato per età e periodo di calendario con

l'analisi della regressione di Poisson. IRR raggiunge il valore minimo nella classe 15 e più anni dalla vaccinazione (IRR=0.50; p=0.407).

La tabella 9 mostra i risultati dello studio caso-controllo per melanoma. Gli OR nelle classi di TSV sono aggiustati per età e sesso con l'analisi della regressione logistica. OR raggiunge il valore più basso nella classe 15 e più anni dalla vaccinazione (OR=0.30; p=0.137).

Figura 6 mostra l'andamento di IRR e OR per melanoma nelle classi di TSV. I valori di OR sono sistematicamente più bassi dei valori di IRR in ogni classe di TSV.

Discussione dei risultati

Studio coorte vs. studio caso-controllo

Lo studio è iniziato con un disegno "coorte" che prevedeva la raccolta e il follow-up dei soggetti vaccinati contro la febbre gialla, per evidenziare in questi una riduzione del rischio di cancro della mammella e/o del melanoma, atteso sulla base di studi meccanicistici [Krone 2005].

Per studiare ulteriormente il rapporto tra YFV e rischio di cancro è stato adottato un approccio caso-controllo in cui tumori che esprimono alti livelli HERV-K-MEL (melanoma e tumore della mammella) sono stati contrastati uno alla volta con un gruppo di riferimento costituito dai rimanenti tumori.

Una giustificazione teorica per l'inclusione dei tumori non esprimenti HERV-K-MEL nel gruppo di controllo è che questo gruppo "rappresenta" l'ipotesi nulla,

che non vi è alcuna relazione tra una causa (YFV) e un effetto (cancro). Un'altra ragione è che pazienti affetti da diverse malattie, reclutati dalla stessa coorte, potrebbero essere simili tra loro in termini di provenienza geografica, classe sociale e altri fattori che influenzano la richiesta di somministrazione di YFV. Se due malattie condividono i fattori di rischio, questo potrebbe ridurre il rumore di fondo e aumentare sia la potenza e la specificità dell'associazione [Curtis 2011].

D'altra parte sarebbe stato difficile e impraticabile selezionare i controlli da una popolazione geograficamente e temporalmente definita, visto che:

- i territori delle varie ULSS venete hanno cambiato estensione geografica nel tempo;
- vi erano differenti date di inclusione delle varie aree della Regione nel VTR;
- i centri vaccinali hanno cominciato la loro attività in differenti momenti.

Invece i controlli del nostro studio sono stati selezionati da pazienti neoplastici provenienti dalla stessa finestra spazio-temporale che aveva generato i casi.

I risultati mostrano che lo studio caso-controllo (quindi la stima di OR) esprime l'effetto protettivo indotto da YFV in maniera più accentuata rispetto allo studio coorte (stima di IRR) per quanto riguarda sia il tumore della mammella (tabelle 6-7) sia il melanoma (tabelle 8-9).

A tal proposito, per spiegare la ragione dello scostamento sistematico tra OR e IRR, la presunta relazione causale fra YFV, HERV-K e cancro è stata rappresentata usando un artificio grafico denominato Directed Acyclic Graph (DAG) [Greenland 1999, Geneletti 2011]. Il grafico è "diretto" nel senso che ogni

connessione fra due variabili è rappresentata da una freccia (che costituisce una relazione), ed “aciclico” per il fatto che non contiene “cicli”.

Nel DAG (vedi figura 7), le lettere indicano i “nodi” che rappresentano le variabili del modello causale. Il percorso è aperto se contiene una catena ($\rightarrow E \rightarrow$) o una biforcazione ($\leftarrow C \rightarrow$) ed è bloccata se contiene una biforcazione invertita ($\rightarrow D \leftarrow$).

La figura 8 mostra due DAG: DAG #1 che si riferisce ai tumori esprimenti HERV-K e DAG #2 per i tumori che non esprimono HERV-K. In entrambi i DAG, “A” è YFV (la causa), “C” i confondenti (esposizione al sole e/o livello socio economico e/o altri fattori), “B” è l’outcome (cancro), “D” l’antigene HERV-K ed “E” la risposta immunitaria. La vaccinazione comporta una risposta immunitaria che può cross-reagire con D, diminuendone l’espressione e quindi riducendo il rischio di cancro (percorso $A \rightarrow E \rightarrow D \rightarrow B$). Nel DAG#2 possono essere rappresentati i tumori che non esprimono HERV-K. Per questi tumori l’unica via attraverso cui si produce il cancro è il percorso $C \rightarrow B$. La mancanza di D non consente l’effetto protettivo dovuto a YFV attraverso la cross-reazione immunitaria.

Se da un lato l’approccio grafico del DAG è efficace nell’esplicitare relazioni causali, lo stesso però si rivela insufficiente a quantificare la forza di un’associazione statistica (le frecce possono cioè essere interpretate come causali senza ulteriore apporto esterno).

In conclusione, in base al modello causale DAG, i tumori HERV-K positivi sono influenzati da fattori di rischio e anche dal fattore protettivo YFV; al contrario i

tumori HERV-K negativi possono solo essere influenzati da fattori di rischio. Ecco che contrastando in uno studio caso-controllo i tumori esprimenti HERV con tutti gli altri tumori HERV negativi combinati, lo studio caso-controllo (quindi la stima di OR) esprime l'effetto protettivo indotto da YFV in maniera più accentuata che lo studio coorte (in cui la stima di rischio è espressa da IRR) [Cegolon 2013].

Effetto aspecifico vs. effetto specifico del YFV

Come già detto, Krone [2005] ha supposto che YFV possa avere un epitopo analogo a quello di HERV-K-MEL, capace di generare popolazioni di cellule T cross-reattive che sono in grado di riparare o uccidere i melanociti che esprimono questo antigene (figura 3 e figura 4).

Per contro, è stato proposto che gli HERV promuovono la melanoma-genesi attraverso un sovvertimento dell'immuno-sorveglianza mediata da cellule T regolatorie. [Mangenev 2005]. In generale, il cancro deriva da una popolazione di cellule trasformate che hanno sviluppato la capacità di sfuggire all'immuno-sorveglianza [Dunn 2002, Garcia-Lora 2003].

Utilizzando un metodo di RNA interference (RNAi), Mangenev [2005] ha dimostrato che l'abbattimento di retrovirus associati al melanoma (MelARV), HERV spontaneamente indotti nel melanoma murino [Li 1999], portava al rigetto di cellule tumorali in topi immunocompetenti. La ri-espressione del solo gene MelARV env comportava che le cellule tumorali venivano rigettate solo parzialmente, indicando così che il gene MelARV env contribuisce ad evadere la risposta immunitaria. Inoltre, in un modello murino, molti geni HERV env

codificanti erano immunosoppressivi in vivo [Mangeny 2001].

Effetto oncolitico vs. effetto immunologico

YF 17D è un vaccino vivo attenuato. Il picco di replicazione virale per la febbre gialla è a 5-7 giorni ed è inosservabile da 14 giorni in poi [Pulendran 2009].

Pertanto, il meccanismo di protezione potrebbe essere un effetto oncolitico (un virus oncolitico è un virus che infetta preferenzialmente e uccide le cellule tumorali) di YFV. L'effetto oncolitico potrebbe spiegare l'andamento a "U" del cancro mammario, in cui l'effetto è precoce e tende ad esaurirsi nel tempo, ma non l'andamento del rischio di melanoma, ove il massimo effetto protettivo si verifica dopo 10 anni dalla vaccinazione.

Dopo la sua somministrazione, YFV induce rapidamente anticorpi neutralizzanti IgM che arrivano al loro picco a due settimane dalla vaccinazione prima di calare, ma possono persistere fino a 18 mesi. Gli anticorpi neutralizzanti IgG sono invece prodotti più lentamente e persistono fino a 40 anni. La risposta delle cellule T CD8+ si sviluppa rapidamente dopo la vaccinazione, con un picco al quindicesimo giorno (con circa il 15% delle cellule T CD8+ attivate al quindicesimo giorno) per poi calare e tornare a livelli normali verso il 30° giorno. Vi è inoltre una vivace risposta di cellule T CD4 + mista: T helper 1 (Th1) e TH2 [Pulendran 2009].

Come già accennato, gli epitopi HERV-K vengono presentati sulla superficie delle cellule maligne e potrebbero quindi essere utilizzati come target della risposta immunitaria allo scopo di riparare o eliminare le cellule. In un recente studio, anticorpi monoclonali specifici anti-HERV-K hanno dimostrato la

capacità di inibire la crescita e di indurre l'apoptosi di cellule di cancro della mammella in vitro. Inoltre, topi trattati con anticorpi monoclonali 6H5 hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa della crescita di tumori trapiantati rispetto ai topi trattati con immunoglobuline di controllo ($p < 0.001$) [Wang-Johanning 2012].

Pertanto, se la risposta immunitaria innescata da YFV cross-reagisce con le proteine HERV-K Env, l'effetto protettivo potrebbe essere una reazione immunitaria (figura 3 e 4).

Effetto su cancro mammario vs. effetto su melanoma

Il presente studio intendeva indagare se i soggetti vaccinati con YFV 17D avessero una probabilità significativamente inferiore di sviluppare il tumore della mammella e/o il melanoma, e si prefiggeva inoltre di verificare l'andamento temporale della protezione dopo la vaccinazione.

Ci si aspettava un modello di protezione simile per entrambi i tumori, cioè una riduzione del rischio 10 anni dopo la vaccinazione, un risultato coerente con le conclusioni delle precedenti valutazioni della relazione tra altri tipi di vaccinazione e rischio di melanoma [Krone 2003, Kölmel 1999, Pfahlberg 2002].

È, infatti, biologicamente plausibile che l'effetto protettivo debba essere evidente solo quando YFV è somministrato prima di un "critical point", in una fase precoce della carcinogenesi che deve precedere di molti anni la presentazione clinica del tumore. L'espressione di una proteina retro-virale può essere associata alla trasformazione maligna di melanociti, e la base della protezione contro il

melanoma da parte di YFV, come già ipotizzato per BCG e vaccino contro il vaiolo [Krone 2003], potrebbe essere l'induzione di popolazioni di cellule T cross-reattive mediante mimetismo molecolare (omologia di sequenza degli aminoacidi). Nella fase iniziale del processo tumorale, le cellule T indotte potrebbero facilitare la riparazione o la citolisi delle cellule maligne che esprimono l'antigene HERV-K-MEL, prima di ulteriori mutazioni che rendono il tumore resistente all'attacco immunitario [Kim 2007].

I risultati dello studio caso-controllo hanno confermato che YFV conferiva un certo grado di protezione verso il melanoma se il vaccino veniva somministrato prima della trasformazione maligna. Invece, sia lo studio coorte sia lo studio caso controllo, hanno evidenziato un andamento a "U" del rischio di cancro mammario con protezione massima dopo 5-6 anni di TSV (come per la maggior parte, se non tutti, i vaccini). Se la protezione è un effetto immunitario, ci dovrebbero essere due risposte immunitarie (una risposta umorale e una risposta cellulare) coesistenti che cross-reagiscono contro gli antigeni HERV-K e YFV (figura 3 e 4).

Purtroppo non è stato possibile raccogliere sufficiente informazione sui fattori confondenti di rilievo (livello socio-economico, fenotipo cutaneo) e pregresse vaccinazioni (in particolare BCG e vaiolo). Inoltre i risultati del presente studio vanno interpretati con cautela dal momento che derivano dall'analisi di uno studio caso-controllo: possono cioè essere utilizzati più che altro per spiegare il meccanismo della protezione dal cancro piuttosto che il grado della stessa nella popolazione generale.

Hodges Vasquez et al. [2012] ha recentemente condotto uno studio caso-controllo su 7.010 militari delle forze armate degli Stati Uniti per verificare l'associazione tra YFV e rischio di melanoma. I casi totali di melanoma in questa coorte diagnosticati fra il 1999 ed il 2009 erano 638, e ciascuno di loro è stato confrontato con 10 controlli sani selezionati da altri militari in servizio. Lo studio ha concluso per l'assenza di un'associazione significativa tra YFV 17D e rischio di melanoma. Tuttavia il TSV massimo era solo di 11.5 anni.

Non esiste uno studio simile che abbia investigato il rischio di cancro della mammella e YFV.

Considerazioni sulla relazione causale HERV-K e cancro

Poiché il cancro in genere è un evento multifattoriale, la soppressione del solo epitopo HERV-K-MEL potrebbe sembrare un meccanismo di prevenzione della cancerogenesi piuttosto limitato. Secondo il modello generale di causalità di Rothman [1976], una “causa sufficiente” (quella che porta inevitabilmente allo sviluppo della neoplasia) è normalmente composta da diverse componenti chiamate “cause contribuenti”. Ci possono essere varie combinazioni di cause contribuenti e la stessa malattia può essere il risultato di più cause sufficienti.

Secondo questo modello la rimozione, per esempio della causa contribuyente “B” previene tutte le neoplasie originatesi dalle cause sufficienti I e II, anche se tutte le altre cause sono presenti o addirittura sconosciute. Inoltre, se una causa contribuyente, per esempio E, è rara, essa diventa un forte determinante del tumore se le altre cause sono frequenti. Questo ragionamento può essere applicato anche all'interazione immunitaria anti-YFV/anti HERV-K-MEL.

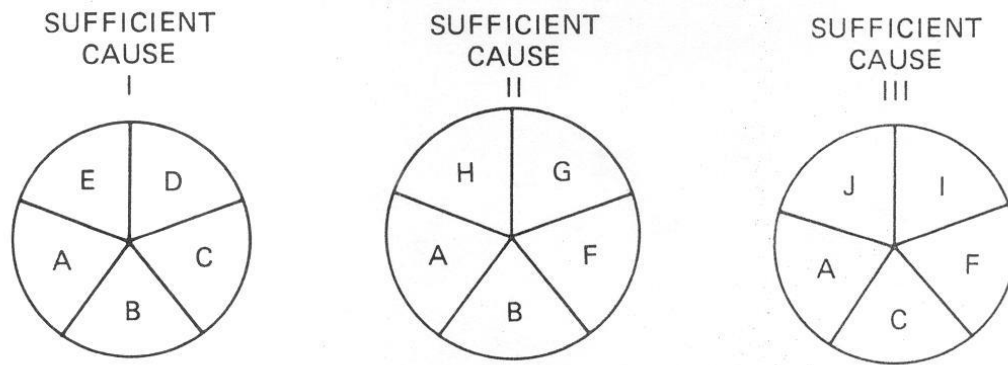


Fig. 2-1. Conceptual schematization of three sufficient causes for a disease [Rothman, 1976].

Conclusioni

Sembra opportuno confermare questi risultati e condurre ulteriori analisi in altre coorti con TSV possibilmente più lunghi. Sembra inoltre opportuno eliminare o almeno attenuare l'effetto di potenziali fattori confondenti come altre vaccinazioni (BCG, vaiolo e altri vaccini raccomandati per viaggi tropicali) e soprattutto il livello socio-economico, che è un fattore rischio riconosciuto per vari tumori fra cui il melanoma [Shack 2008, Markovic 2007] ed il cancro del seno [Shack 2008, Yost 2011, Pukkala 1999, Barbone 1996].

Se l'associazione negativa tra YFV e tumori esprimenti HERV-K-MEL fosse confermata potrebbero aprirsi nuove possibili strategie per la prevenzione del cancro. Nonostante anti-corpi monoclonali contro HERV-K Env hanno recentemente dimostrato interessanti prospettive nella terapia del tumore del seno [Wang Johanning 2012], l'immuno-terapia rimane ancora più complicata e meno vantaggiosa rispetto all'immuno-prevenzione [Grange 2009, Forni 2000].

Inoltre l'efficacia dell'immuno-terapia nello studio di Wang-Johanning [2008] è stata valutata in topi portatori di tumori xeno-trapiantati, quindi ora sarebbe

necessario testarli in pazienti con cancro al seno [Wang Johanning 2012]. Lo YFV invece è largamente disponibile ed affidabile [Roukens 2008, Pulendran 2009] ed in grado di stimolare un'immunità preventive cellulare contro il cancro, dal momento che la risposta anti-corpale probabilmente non è l'unica forma di risposta immunitaria implicate contro i tumori [Krone 2005].

Molti patogeni esprimono antigeni con una sequenza amino-acidica omologa all'epitopo HERV-K-MEL, ma o le rispettive proteine non sono utilizzate per allestire i rispettivi vaccini (per esempio nel caso del tetano o il vaccino acellulare della pertosse) o la maggior parte delle preparazioni sono formulate per indurre un risposta umorale invece che cellulare [Krone 2005]. Infine, nonostante l'evidenza in favore del vaccino per il vaiolo e per il BCG nel prevenire il melanoma [Krone 2005] e l'aumento di incidenza globale della tubercolosi, la re-introduzione di questi due vaccini non sembra ragionevole [Grange 2009].

REFERENZE

Ahn K, Kim HS: Structural and quantitative expression analyses of HERV gene family in human tissues. *Mol Cells* 2009, 28(2):99–103.

Armitage P, Berry G, Matthews JNS. *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Science. 2002.

Baltimore D: Retroviruses and retrotransposons: the role of reverse transcription in shaping the eukaryotic genome. *Cell* 1985, 40:481–82.

Bannert N, Kurth R: Retroelements and the human genome: new perspectives on an old relation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101:14572–14579.

Barbone F, Filiberti R, Franceschi S, Talamini R, Conti E, Montella M et al. Socioeconomic status, migration and the risk of breast cancer in Italy. *Int J Epidemiol*. 1996 Jun;25(3):479-87.

Belshaw R, Dawson AL, Woolven-Allen J, Redding J, Burt A, Tristem M: Genomewide screening reveals high levels of insertional polymorphism in the human endogenous retrovirus family HERV-K (HML-2): implications for present day activity. *J Virol* 2005, 79:12507–12514.

Boller K, Schönfeld K, Lischer S, Fischer N, HoVmänn A, Kurth R, Tönjes RR: Human endogenous retrovirus HERV-K113 is capable of producing intact viral particles. *J Gen Virol* 2008, 89(Pt 2):567–572.

Boyd MT, Foley B, Brodsky I: Evidence for copurification of HERV-K-related transcripts and a reverse transcriptase activity in human platelets from patients with essential thrombocythemia. *Blood* 1990, 90:4022–4030.

Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J: Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer* 2012, doi:10.1002/ijc.27711 [Epub ahead of print].

Breslow NE, Day NE. *Statistical methods in Cancer research*. World Health Organization-International Agency for Research on Cancer. 1987.

Büscher K, Trefzer U, Hofmann M, Sterry W, Kurth R, Denner J: Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines. *Cancer Res* 2005, 65:4172–4180.

Cegolon L, Salata C, Weiderpass E, Vineis P, Palù G, Mastrangelo G. Human endogenous retroviruses and cancer prevention: evidence and prospects. *BMC Cancer*. 2013: BMC Cancer. 2013 Jan 3;13:4

Coffin J: Endogenous viruses. In *RNA Tumor Viruses*. 2nd edition. Edited by Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press; 1984:1109–1203.

Contreras-Galindo R, Kaplan MH, Leissner P, Verjat T, Ferlenghi I, Bagnoli F, Giusti F, Dosik MH, Hayes DF, Gitlin SD, Markovitz DM: Human endogenous retrovirus K (HML-2) elements in the plasma of people with lymphoma and breast cancer. *J Virol* 2008, 82:9329–36.

Contreras-Galindo R, López P, Vélez R, Yamamura Y: HIV-1 infection increases

the expression of human endogenous retroviruses type K (HERV-K) in vitro. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007, 23(1):116–22.

Curtis D, Vine AE, McQuillin A et al. Case-case genome-wide association analysis shows markers differentially associated with schizophrenia and bipolar disorder and implicates calcium channel genes. *Psychiatr Genet.* 2011 Feb;21(1):1-4.

Depil S, Roche C, Dussart P, Prin L: Expression of a human endogenous retrovirus, HERV-K, in the blood cells of leukaemia patients. *Leukemia* 2002, 16:254–259.

Dolei A, Perron H: The multiple sclerosis-associated retrovirus and its HERV-W endogenous family: a biological interface between virology, genetics and immunology in human physiology and disease. *J Neurovirol* 2009, 15:4–13.

Dolittle WF, Sapienza C: Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 1980, 284:601–3.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H et al. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3:991– 8.

Ejthadi HD, Martin JH, Junying J, et al: A novel multiplex RT-PCR system detects human endogenous retrovirus-K in breast cancer. *Arch Virol* 2005, (1):177–184.

Flockerzi A, Burkhardt S, Schempp W, Meese E, Mayer J: Human endogenous retrovirus HERV-K14 family: status, variants, evolution and mobilization of other cellular sequences. *J Virol* 2005, 79:2941–2949.

Forni G, Lollini, Musiani P, Colombo MP: Immunoprevention of Cancer: Is the Time Ripe? *Cancer Res* 2000, 60:2571–2575.

Friedlander A, Patarca R: Endogenous proviruses. *Crit Rev Oncog* 1999, 10:129–159.

Gabriel U, Steidler A, Trojan L, et al: Smoking increases transcription of human endogenous retroviruses in a newly established in vitro cell model and in normal urothelium. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2010, 26(8):883–8.

Garcia-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 2003; 195:346–55.

Geneletti S, Gallo V, Porta M, Khoury MJ, Vineis P. Assessing causal relationships in genomics: From Bradford-Hill criteria to complex gene-environment interactions and directed acyclic graphs. *Emerg Themes Epidemiol.* 2011 Jun 9;8(1):5. doi: 10.1186/1742-7622-8-5.

Gifford R, Tristem M: The evolution distribution and diversity of endogenous retroviruses. *Virus Genes* 2003, 26:291–315.

Gimenez J, Montgiraud C, Pichon JP, Bonnaud B, Arsac M, Ruel K, Bouton O, Mallet F: Custom human endogenous retroviruses dedicated microarray identiWes self-induced HERV-W family elements reactivated in testicular cancer upon methylation control. *Nucl Acids Res* 2010, 38:2229–2246.

Gogvadze E, Stukacheva E, Buzdin A, Sverdlov E: Human specific modulation of transcriptional activity provided by endogenous retroviral insertions. *J Virol* 2009, 83:6098–6105.

- Goila Gaur R, Sterbel K. HIV-1 Vif, APOBEC, and Intrinsic Immunity. *Retrovirology* 2008, 5:51.
- Golan M, Hizi A, Resau JH, et al: Human endogenous retrovirus (HERV-K) reverse transcriptase as a breast cancer prognostic marker. *Neoplasia* 2008, 10(6):521–533.
- Grange JM, Krone B, Kölmel KF, Mastrangelo G: Can prior vaccinations against certain infections confer protection against developing melanoma? *MJA* 2009, 191(9):478–479.
- Greenland S, Pearl J, Robins JM: Causal diagrams for epidemiologic research. *Epidemiology* 1999, 10(1):37–48.
- Griffiths DL: Endogenous retroviruses in the human genome sequence. *Genome Biol* 2001, 2:1017.1–1017.5.
- Hahn S, Ugurel S, Hanschmann KM, et al: Serological response to human endogenous retrovirus K in melanoma patients correlates with survival probability. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008, 24:717–23.
- Hodges-Vazquez M, Wilson JP, Hughes H, Garman P: The yellow fever 17D vaccine and risk of malignant melanoma in the United States military. *Vaccine* 2012, 30:4476–9.
- Hohenadl C, Germaier H, Walchner M, Hagenhofer M, Herrmann M, Sturzl, M, Kind P, Hehlmann R, Erfle V, Leib-Mosch C: Transcriptional activation of endogenous retroviral sequences in human epidermal keratinocytes by UVB irradiation. *J Invest Dermatol* 1999, 113:587–594.

Horsley V, Pavlath GK: NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *J Cell Biol* 2002, 156:771–774.

Huang G, Li Z, Wan X, Wang Y, Dong J. Human endogenous retroviral K element encodes fusogenic activity in melanoma cells. *J Carcinog.* 2013 Mar 16; 12:5.

Hughes JF, Coffin JM: Human endogenous retroviral elements as indicators of ectopic recombination events in the primate genome. *Genetics* 2005, 171:1183–1194.

Hulka BS, Moorman PG: Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas* 2001, 38:103–113. discussion 113–106.

Humer J, Waltenberger A, Grassauer A, et al: Identification of a melanoma marker derived from melanoma-associated endogenous retroviruses. *Cancer Res* 2006, 66:1658–63.

Hunsmann & Krone 2005. Vaccination against malignant melanoma. European Patent EP1586330A1

International Agency for Research on Cancer (IARC): Globocan 2008; Available at: <http://globocan.iarc.fr>. Accessed in November 2012.

International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409:860–921.

Ishida T, Obata Y, Ohara N, et al: Identification of the HERV-K gag antigen in prostate cancer by SEREX using autologous patient serum and its

immunogenicity. *Cancer Immun* 2008, 8:15.

Kalter SS, Helmke RJ, Heberling RL, Panigel M, Fowler AK, Strickland JE, Hellman A: Brief communication: C-type particles in normal human placentas. *J Natl Cancer Inst* 1973, 50:1081–1084.

Katsumata K, Ikeda H, Sato M, Ishizu A, Kawarada Y, Kato H, Wakisaka A, Koike T, Yoshiki T: Cytokine regulation of env gene expression of human endogenous retrovirus-R in human vascular endothelial cells. *Clin Immunol* 1999, 93:75-80

Kazazian HH: Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 2004, 303:1626–1632.

Kelsey JL, Bernstein L: Epidemiology and prevention of breast cancer. *Ann Rev Public Health* 1996, 17:47–67.

Kershaw MH, Hsu C, Mondesire W, et al: Immunization against endogenous retroviral tumour-associated antigens. *Cancer Res* 2001, 61(21):7920–4.

Khan AS, Muller J, Sears JF: Early detection of endogenous retroviruses in chemically induced mouse cells. *Virus Res* 2001, 79:39–45.

Kim YS, Ko H, Yoon C et al. Social determinants of smoking behavior: the Healthy Twin Study, Korea. *J Prev Med Public Health*. 2012 Jan;45(1):29-36

Kirkwood BR, Sterne JAC. *Essential Medical Statistics*. Blackwell Science. 2003.

Koelmel KF, Gefeller O, Haferkamp B: Febrile infections and malignant melanoma: results of a case-control study. *Melanoma Res* 1992, 2:207–211.

Kölmel KF, Pfahlberg A, Mastrangelo G, Niin M, Botev IN, Seebacher C, et al. Infections and melanoma risk: results of a multicentric EORTC casecontrolstudy. *Melanoma Res* 1999;9:511–9.

Krone B, Grange JM: Melanoma, Darwinian medicine and the inner world. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010, 136:1787–1794.

Krone B, Kölmel KF, Grange JM, Mastrangelo G, Henz BM, Botev IN, Niin M, Seebacher C, Lambert D, Shafir R, Kokoschka EM, Kleeberg UR, Gefeller O, Pfahlberg A: Impact of vaccinations and infectious diseases on the risk of melanoma—evaluation of an EORTC case-control study. *Eur J Cancer* 2003, 39(16):2372–8.

Krone B, Kölmel KF, Henz BM, Grange JM: Protection against melanoma by vaccination with Bacille Calmette-Guerin (BCG) and/or vaccinia: an epidemiology-based hypothesis on the nature of a melanoma risk factor and its immunological control. *Eur J Cancer* 2005, 41(1):104–17.

Larsson E, Andersson G: Beneficial role of human endogenous retroviruses: facts and hypotheses. *Scand J Immunol* 1998, 48:329–338.

Laufer G, Mayer J, Mueller BF, Mueller-Lantsch N, Ruprecht K: Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clariWes the origin of multiple sclerosis-associated env sequences. *Retrovirology* 2009, 6:37–53.

Li M, Huang X, Zhu Z, Gorelik E. Sequence and insertion sites of murine

melanoma-associated retrovirus. *J Virol* 1999; 73:9178–86.

Li WH, Gu Z, Wang H, et al: Evolutionary analyses of the human genome. *Nature* 2001, 409:847–49.

Libri V, Miesen P, van Rij RP, Buck AH. Regulation of microRNA biogenesis and turnover by animals and their viruses. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Jan 26. [Epub ahead of print]

Löwer R, Boller K, Hasenmaier B, Korbmacher C, Muller-Lantzsch N, Lower J, Kurth R: Identification of human endogenous retroviruses with complex mRNA expression and particle formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, 90:4480–4484.

Maddams J, Brewster D, Gavin A, Steward J, Elliott J, Utley M, Møller H: Cancer prevalence in the United Kingdom: estimates for 2008. *Br J Cancer* 2009, 101(3):541–7.

Mangeny M, de Parseval N, Thomas G et al. The full-length envelope of an HERV-H human endogenous retrovirus has immunosuppressive properties. *J Gen Virol* 2001; 82:2515–18.

Mangeny M, Pothlichet J, Renard M, et al: Endogenous retrovirus expression is required for murine melanoma tumor growth in vivo. *Cancer Res* 2005, 65:2588–91.

Mariotto AB, Yabroff KB, Shao Y, Feuer EJ, Brown ML: Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010–2020. *JNCI* 2011, 103:117–123.

Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, et al: Malignant melanoma in the 21st century. Part 1. Epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 2007, 82:364–80.

Mastrangelo G, Krone B, Fadda E et al. Does yellow fever 17D vaccine protect against melanoma? *Vaccine* 2009; 27:588-91.

Mayer J, Sauter M, Rácz A, Scherer D, Mueller-Lantsch N, Meese E: An almost-intact human endogenous retrovirus K on human chromosome 7. *Nat Genet* 1999, 21:257–8.

McPherson K, Steel CM, Dixon JM: ABC of breast diseases. Breast cancer epidemiology, risk factors and genetics. *BMJ* 2000, 321:624–628.

Moyes D, Griffithsm DJ, Venables PJ: Insertional polymorphisms. A new lease of life for endogenous retrovirus in human disease. *Trends Genet* 2007, 2:326–333.

Mullins CS, Linnebacher M. Human endogenous retroviruses and cancer: causality and therapeutic possibilities. *World J Gastroenterol*. 2012 Nov 14;18(42):6027-35.

Muster T, Waltenberger A, Grassauer A, Hirschl S, Caucig P, Romirer I, Fodinger D, Seppel H, Schanab O, Magin-Lachmann C, Lower R, Jansen B, Pehamberger H, Wolff K: An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res* 2003, 63:8735–8741.

Ono M, Kawakami M, Ushikubo H: Stimulation of expression of the human endogenous retrovirus genome by female steroid hormones in human breast

cancer cell line T47D. *J Virol* 1987, 6:2059–2062.

Ono M: Molecular cloning and long terminal repeat sequences of human endogenous retrovirus genes related to types A and B retrovirus genes. *J Virol* 1986, 58(3):937–944.

Orge L, Crick FHC: Selfish DNA. the ultimate parasite. *Nature* 1980, 284:604–7.

Oricchio E, Sciamanna I, Beraldi R, et al: Distinct roles for LINE-1 and HERVK retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression. *Oncogene* 2007, 26:4226–33.

Pfahlberg A, Kölmel KF, Grange JM, Mastrangelo G, Krone B, Botev IN, et al. Inverse association between melanoma and previous vaccinations against tuberculosis and smallpox: results of the FEBIM study. *J Invest Dermatol* 2002;119:570–5.]

Pukkala E, Weiderpass W. Time trends in socio-economic differences in incidence rates of cancers of the breast and female genital organs (Finland, 1971–1995). *International Journal of Cancer*. 1999; 81: 56-61.

Pulendran B: Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nat Rev Immunol* 2009, 9(10):741–7.

Ramachandran PV, Ignacimuthu S. RNA interference--a silent but an efficient therapeutic tool. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013 Mar;169(6):1774-89.

Reiche J, Pauli G, Ellerbrok H: Differential expression of human endogenous retrovirus K transcripts in primary human melanocytes and melanoma cell lines after UV irradiation. *Melanoma Res* 2010, 20(5):435–40.

Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlader N, Horner MJ, et al (Eds): SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2007. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005. Accessed July 2008.

Rook GA, Dalgleish A: Infection, immunoregulation, and cancer. *Immunol Rev* 2011, 240:141–159.

Rote NS, Chakrabarti S, Stetzer BP: The role of human endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. *Placenta* 2004, 25:673–683.

Rothman KJ. *Modern Epidemiology*. Little, Brown and Company. 1976

Rothman KJ, Greenland S. *Modern Epidemiology*. Lippincott-Williams & Williams. 2008.

Roukens AH, Visser LG: Yellow fever vaccine: past, present and future. *Expert Opin Biol Ther* 2008, 8:1787–95.

Ryan FP: *Virolution*. New York: Harper Collins; 2009.

Sarid R, Gao SJ: Viruses and human cancer: from detection to causality. *Cancer Lett* 2011, 305(2):218–27.

Savu A, Potter J, Li S, Yasui Y: Breast cancer and microbial cancer incidence in female populations. *Int J Cancer* 2008, 123:1094–1099.

Schanab O, Humer J, Gleiss A, et al: Expression of human endogenous retrovirus K is stimulated by ultraviolet radiation in melanoma. *Pigment Cell Melanoma*

Res 2011, 24(4):656–65.

Schiavetti F, Thonnard J, Colau D, Boon T, Coulie PG: A human endogenous retroviral sequence encoding an antigen recognized on melanoma by cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res* 2002, 62(19):5510–6.

Sciamanna I, Landriscina M, Pittoggi C, Quirino M, Mearelli C, Beraldi R, Mattei E, Serafino A, Cassano A, Sinibaldi-Vallebona P, Garaci E, Barone C, Spadafora C, et al: Inhibition of endogenous reverse transcriptase antagonizes human tumor growth. *Oncogene* 2005, 24:3923–31.

Seifarth W, Baust C, Murr A, Skladny H, Krieg-Schneider F, Blusch J, Werner T, Hehlmann R, Leib-Mosch C: Proviral structure, chromosomal location, and expression of HERV-K-T47D, a novel human endogenous retrovirus derived from T47D particles. *J Virol* 1998, 72:8384–8391.

Serafino A, Balestrieri E, Pierimarchia P, Matteucci C, Moroni G, Oricchio E, Rasia G, Mastino A, Spadafora C, Garaci E, Sinibaldi Vallebona P: The activation of human endogenous retrovirus K (HERV-K) is implicated in melanoma cell malignant transformation. *Exp Cell Res* 2009, 315:849–862.

Shack L, Jordan C, Thomson ST, Mak V, Møller H: Variation in incidence of breast, lung and cervical cancer and malignant melanoma of skin by socioeconomic group in England. *BMC Cancer* 2008, 8:271.

Singh S, Kaye S, Gore ME, McClure MO, Bunker CB: The role of human endogenous retroviruses in melanoma. *Br J Dermatol* 2009, 161(6):1225–31.

Smith HC, Bennett RP, Kizilyer A, McDougall WM, Prohaska KM. Functions and regulation of the APOBEC family of proteins. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 May;23(3):258-68.

Stengel S, Fiebig U, Kurth R, Denner J: Regulation of human endogenous retrovirus-K expression in melanomas by CpG methylation. *Genes Chromosom Cancer* 2010, 49:401–411.

Stoye JP: Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga. *Nat Rev Microbiol* 2012, 10(6):395–406.

Sverdlov ED: Retroviruses and primate evolution. *Bioessays* 2000, 22:161–171.

Temin HM: Origin and general nature of retroviruses. In *The Retroviridae*, Vol 1. Edited by Levy JA. New York: Plenum Press; 1992:1–18.

Tristem M: Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database. *J Virol* 2000, 74:3715–30.

U.S. Census Bureau, Population Division: Interim Projections Consistent With Census 2000 (released March 2004). Washington D.C: U.S. Census Bureau, Population Division; 2008. <http://www.census.gov/population/www/projections/usinterimproj/>. Accessed July 2008.

Wacholder S, Silverman DT, McLaughlin JK, Mandel JS. Selection of Controls in Case-Control Studies: II. Types of Controls. *American Journal of Epidemiology.* 1992; 135: 1029-1041.

Wagner KH, Brath H: A global view on the development of non communicable diseases. *Prev Med* 2012, 54(Suppl):S38–41.

Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B, Epp L, Lu DW, Johanning GL: Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins on ovarian cancer. *Int J Cancer* 2007, 120(1):81–90.

Wang-Johanning F, Frost AR, Jian B, Epp L, Lu DW, Johanning GL: Quantitation of HERV-K env gene expression and splicing in human breast cancer. *Oncogene* 2003, 22:1528–1535.

Wang-Johanning F, Frost AR, Johanning GL, Khazaeli MB, LoBuglio AF, Shaw DR, Strong TV: Expression of human endogenous retrovirus k envelope transcripts in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001, 7(6):1553–60.

Wang-Johanning F, Radvanyi L, Rycaj K, Plummer JB, Yan P, Jagannadha, Sastry K, Piyathilake C, Hunt KK, Johanning GL: Human Endogenous Retrovirus K Triggers an Antigen-Specific Immune Response in Breast Cancer Patients. *Cancer Res* 2008, 68(14):5869–77.

Wang-Johanning F, Rycaj K, Plummer JB, Li M, Yin B, Frerich K, Garza JG, Shen J, Lin K, Yan P, Glynn SA, Dorsey TH, Hunt KK, Ambs S, Johanning GL: Immunotherapeutic potential of anti-human endogenous retrovirus-k envelope protein antibodies in targeting breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 2012, 104(3):189–210.

Warren JL, Yabroff KR, Meekins A, et al: Evaluation of trends in the cost of initial cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2008, 100(12):888–897.

Weinberg RA: Origins and roles of endogenous retroviruses. *Cell* 1980, 22:643–4.

Yost K, Perkins C, Cohen R, Morris C, Wright W: Socioeconomic status and breast cancer incidence in California for different race/ethnic groups. *Cancer Causes Control* 2011, 12:703–711.

Zeyl C, Beli G: Symbiotic DNA in eukaryotic genomes. *Trends Ecol Evol* 1996, 11:10–5.

TABELLE

Tabella 1 Studio caso-controllo (FEBIM-1): effetto combinato di infezione vaccinazioni sul rischio di melanoma; Odds Ratio (intervallo di confidenza al 95%) per il rischio di melanoma, aggiustato per centro, sesso, età, fenotipo cutaneo, indice di lentiggine, numero di nevi e scottature solari [Krone 2003].

	Numero di infezioni gravi	
	0	≥ 1
No vaccino	1.0	0.37 (0.10-1.42)
BCG o Vaccinia	0.57 (0.33-0.96)	0.29 (0.15-0.57)
BCG & Vaccinia	0.40 (0.23-0.68)	0.33 (0.17-0.65)

Tabella 2. Confronto fra la sequenza amino-acidica di HERV-K-MEL e proteine di diversi virus [Krone 2005]. A = Alanina; L: Leucina; V = Valina; I = Isoleucina; S = Serina; M = Methionina; C = Cisteina; P=Prolina; D=Aspartato; G= Guanina; * = amino-acidi identici; _ = amino-acidi mancanti.

HERV-K-MEL	M	L	A	V	_	I	S	C	A	V
BCG	L	*	*	*	DV	V	P	I	*	*
Vaccinia virus	S	*	*	*	V	*	A	*	*	_
Yellow fever virus	S	*	*	*	_	_	*	S	*	*

Tabella 3. Soggetti della coorte inizialmente registrati suddivisi per ULSS

ULSS	Uffici sanitari	N° soggetti
ULSS n° 3	Bassano del Grappa	532
ULSS n° 6	Vicenza	3329
ULSS n° 8	Montebelluna	552
ULSS n° 9	Treviso	1026
ULSS n° 16	Padova	38293
ULSS n° 20	Verona	27240
USMA @	Dolo	20803
TOTALE		91775

@ = Ufficio Sanità Marittima ed Aerea, Dolo

Tabella 4. Soggetti inclusi nella coorte, suddivisi per ULSS

ULSS	Uffici sanitari	N° soggetti
ULSS n° 3	Bassano del Grappa	388
ULSS n° 6	Vicenza	645
ULSS n° 8	Montebelluna	476
ULSS n° 9	Treviso	728
ULSS n° 16	Padova	5110
ULSS n° 20	Verona	8949
USMA @	Dolo	12010
TOTALE		28.306

@ = Ufficio Sanità Marittima ed Aerea, Dolo

Tabella 5. Distribuzione delle persone anni per età, sesso e tempo trascorso (<10, >10 anni) dalla vaccinazione contro la febbre gialla nella coorte dei 27,905 vaccinati della Regione Veneto dal 1987 al 2005.

Classi di età (anni)	Maschi		Femmine	
	<10 anni	>10 anni	<10 anni	>10 anni
15-19.9	185.0		126.2	
20-24.9	3908.2		2557.9	
25-29.9	13317.0	122.4	10611.6	80.2
30-34.9	18010.3	1992.6	18205.7	1450.5
35-39.9	13189.3	4622.8	16924.9	4762.4
40-44.9	8819.0	4263.6	12575.8	5834.8
45-49.9	7827.0	2911.0	10702.8	4804.7
50-54.9	7381.6	2427.7	9830.1	4023.8
55-59.9	6164.3	2290.5	8290.6	3714.0
60-64.9	4109.8	1861.6	6018.9	2824.4
65-69.9	2372.9	1185.5	3479.1	1877.5
70-74.9	1235.8	868.5	1629.6	1134.5
75-79.9	575.6	481.3	701.1	647.9
80-84.9	186.7	206.1	190.9	258.1
85+	43.3	101.0	31.9	48.8
Totale	87325.7	23334.6	101877.1	31461.5

Tabella 6. Rischi aggiustati per età e periodo di calendario di cancro mammario nelle classi di tempo trascorso dalla vaccinazione (TSV, acronimo inglese): rapporto dei tassi di incidenza (IRR) con i rispettivi intervalli di confidenza al 95% (95% CI) e p-value stimati con la regressione di Poisson.

Classi di TSV (anni)	IRR	95%CI	p-value
0-1.9	reference		
2-3.9	0.65	0.37 - 1.15	0.138
4-5.9	0.64	0.36 - 1.12	0.119
6-7.9	0.92	0.54 - 1.57	0.765
8-9.9	1.11	0.65 - 1.91	0.694
10-14.9	0.84	0.49 - 1.42	0.509
15+	0.92	0.47 - 1.82	0.814

Tabella 7. Rischi aggiustati per età di cancro alla mammella nelle classi di tempo trascorso dalla vaccinazione (TSV, acronimo inglese): odds ratio (OR) con intervalli di confidenza al 95% (95% CI) e p-value stimati con la regressione logistica.

Classi di TSV (anni)	Odds Ratio	95%CI	p-value
0-1.9	reference		
2-3.9	0.33	0.16-0.70	0.004
4-5.9	0.33	0.16-0.70	0.004
6-7.9	0.42	0.21-0.85	0.016
8-9.9	0.54	0.26-1.10	0.091
10-14.9	0.40	0.20-0.78	0.007
15+	0.49	0.21-1.14	0.099

Tabella 8. Rischi aggiustati per età e periodo di calendario di melanoma nelle classi di tempo trascorso dalla vaccinazione (TSV, acronimo inglese): rapporto dei tassi di incidenza (IRR) con i rispettivi intervalli di confidenza al 95% (95% CI) e p-value stimati con la regressione di Poisson.

Classi di TSV (anni)	IRR	95%CI	p-value
0-1.9	reference		
2-3.9	0.78	0.28-2.18	0.641
4-5.9	1.18	0.46-2.99	0.734
6-7.9	1.40	0.55-3.57	0.485
8-9.9	1.13	0.40-3.17	0.823
10-14.9	0.81	0.29-2.29	0.689
15+	0.50	0.09-2.60	0.407

Tabella 9. Rischi aggiustati per età di melanoma nelle classi di tempo trascorso dalla vaccinazione (TSV, acronimo inglese): odds ratio (OR) con intervalli di confidenza al 95% (95% CI) e p-value stimati con la regressione logistica

Classi di TSV (anni)	Odds Ratio	95%CI	p-value
0-1.9	reference		
2-3.9	0.85	0.29-2.47	0.769
4-5.9	1.00	0.39-2.62	0.992
6-7.9	1.24	0.48-3.19	0.661
8-9.9	0.79	0.28-2.20	0.654
10-14.9	0.56	0.21-1.50	0.248
15+	0.30	0.06-1.46	0.137

FIGURE

Figura 1

Possibili meccanismi con cui i retrovirus endogeni umani contribuiscono all' oncogenesi. Trascritti dei retrovirus endogeni umani (HERVs) possono promuovere direttamente il tumore. Long Terminal Repeats (LTR) possono agire come promotori o stimolatori di vicini oncogeni o fattori di crescita. Proteine Env potrebbero attirare le cellule immunitarie regolatorie e creare così un microambiente immunosoppressivo. Infine le proteine Env possono essere direttamente coinvolte nel processo di metastasi [da Mullins 2013].

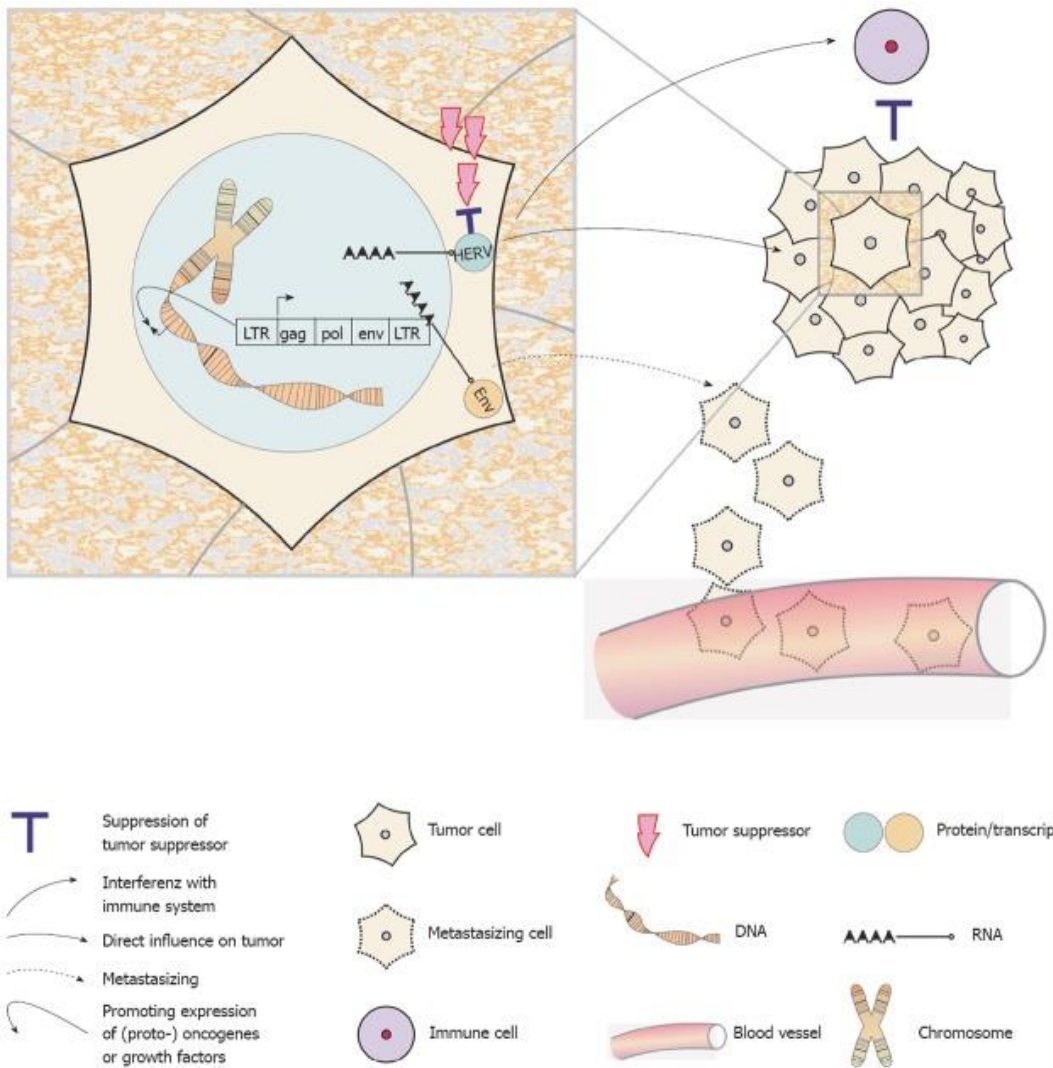


Figura 2

Cascata di eventi dovuta all'omologia tra proteina HERV-K e OREBP (Oxygen responsive element binding protein) [Krone 2005].

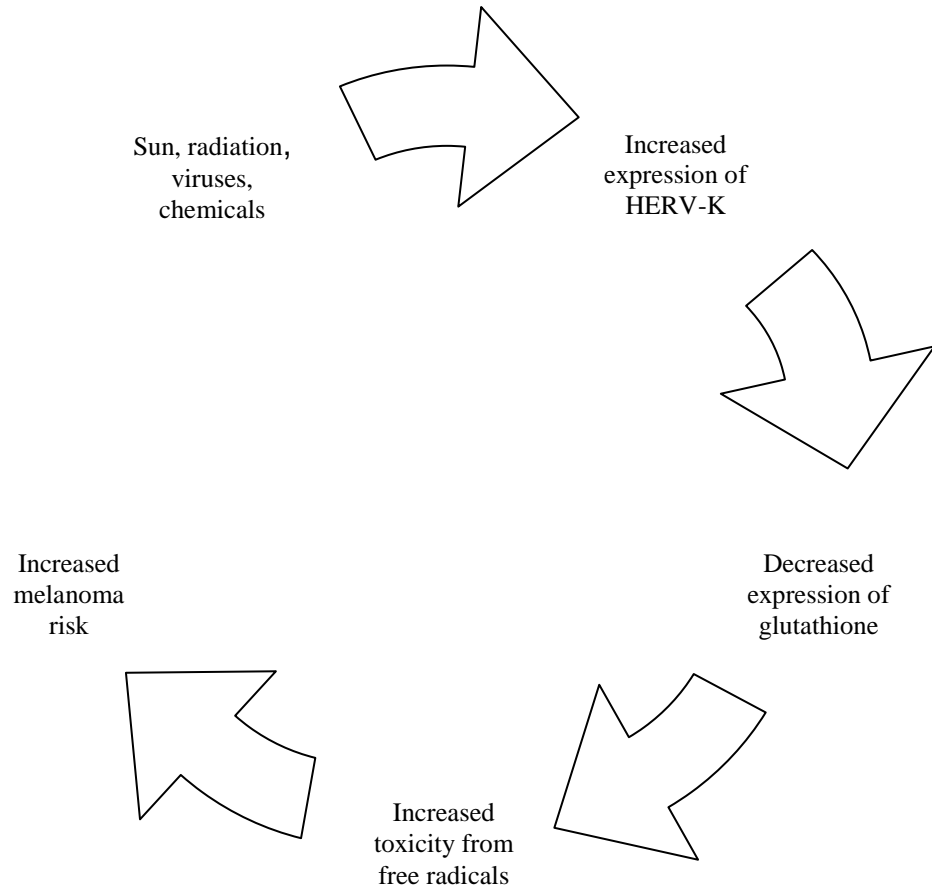


Figura 3

Mimetismo molecolare e risposta immunitaria innescata dal vaccino per la febbre gialla (YFV), che porta alla riduzione del rischio di cancro.

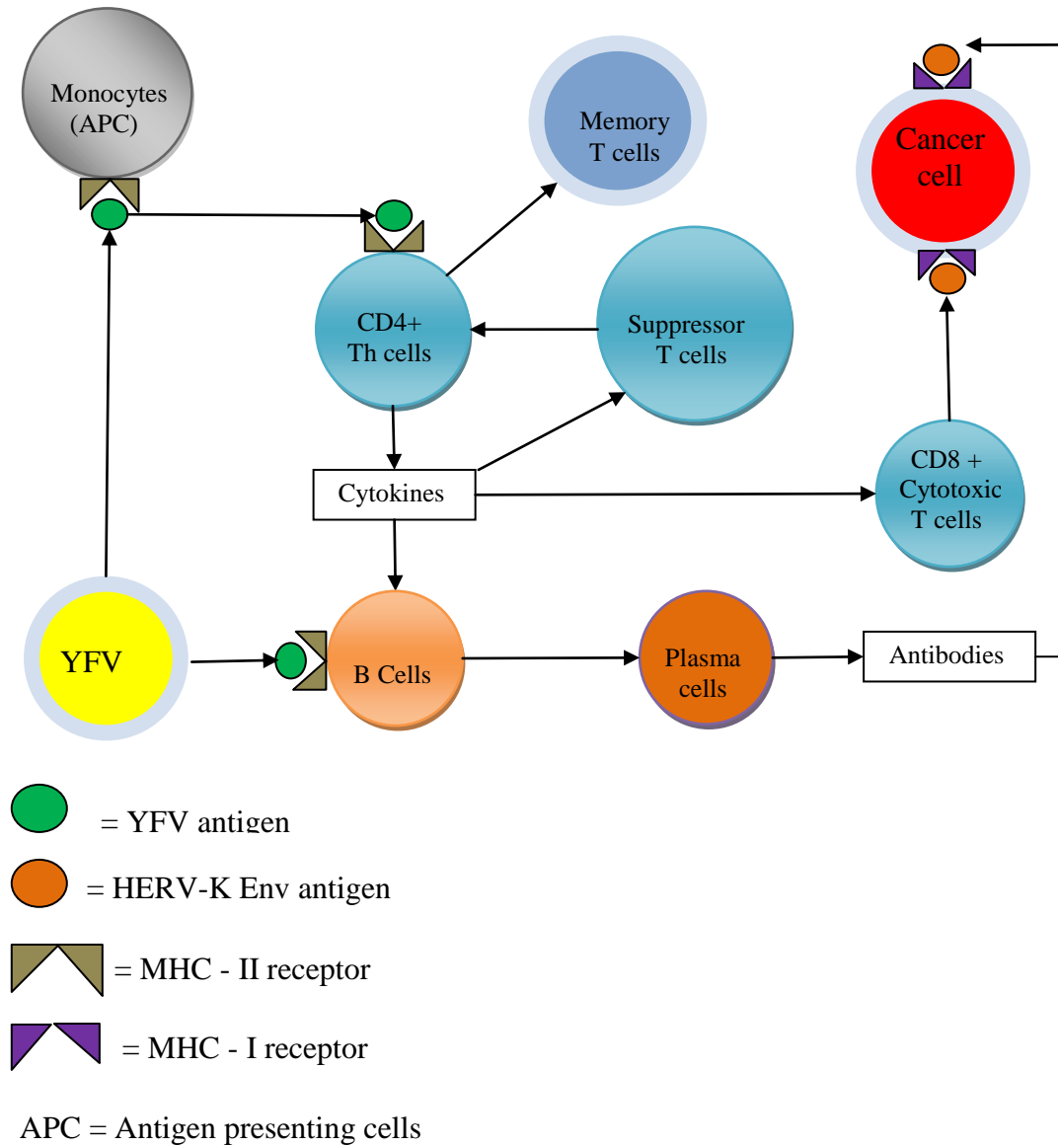
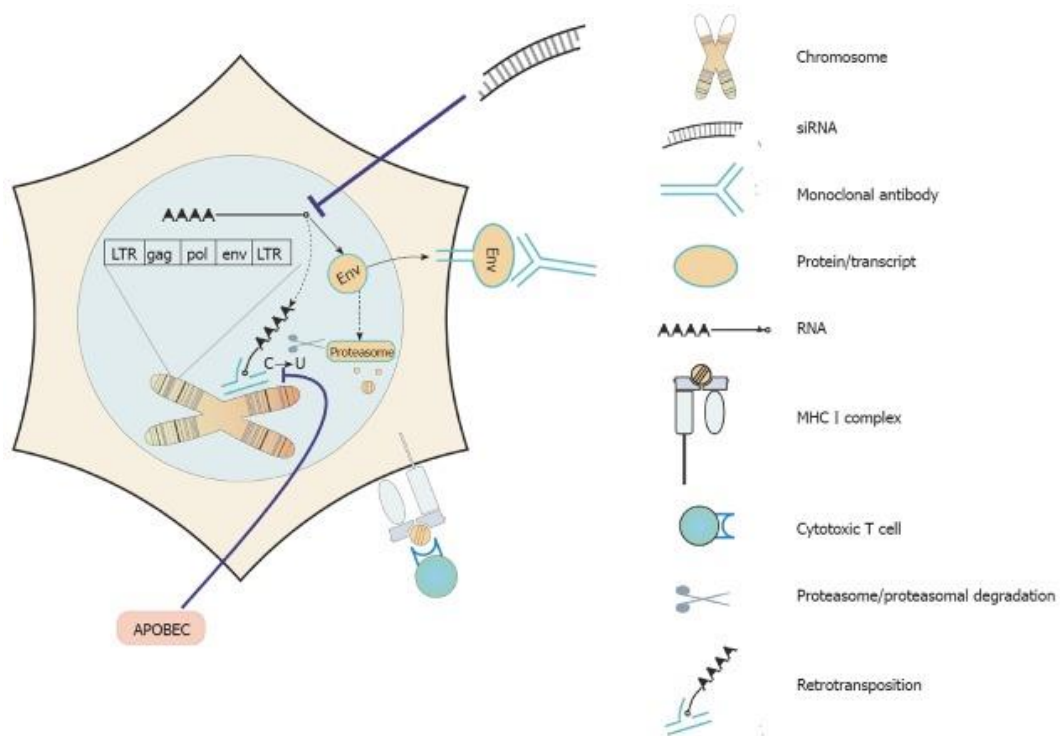


Figura 4.

Potenziale approccio per attaccare le cellule tumorali mediante i retrovirus endogeni umani attivi. Le proteine Env espresse sulla superficie cellulare possono costituire il bersaglio di anticorpi monoclonali. Proteine HERV con specifiche proprietà di antigene tumorale possono anche divenire il bersaglio di cellule T specifiche. LTR: Long terminal repeat; MHC: complesso maggiore di istocompatibilità [da Mullins 2013].



Gli siRNA sono piccoli RNA di circa 19-21 nucleotidi, derivanti ad esempio da trascritti cellulari opportunamente processati che legandosi a sequenze complementari in altri RNA ne determinano il blocco della traduzione o la degradazione agendo da inibitori dell'espressione genica [Goila Gaur 2008, Libri 2013, Ramachandran 2013].

APOBEC è una citosina deaminasi che ha la funzione di deaminare la citosina dell'RNA (che diventa così uracile), destabilizzandolo e promuovendo la mutagenesi; APOBEC é in grado così di inibire la replicazione di virus con genoma ad RNA. Ad esempio, per riuscire a replicarsi nella cellula ospite, il virus HIV deve avvalersi di una propria proteina (VIF) in grado di degradare APOBEC [Smith 2012].

Figura 5

Stime di rischio di tumore della mammella (incidence rate ratio, IRR; odds ratio, OR) per anni trascorsi dalla vaccinazione contro il virus della febbre gialla (scala logaritmica in entrambi gli assi).

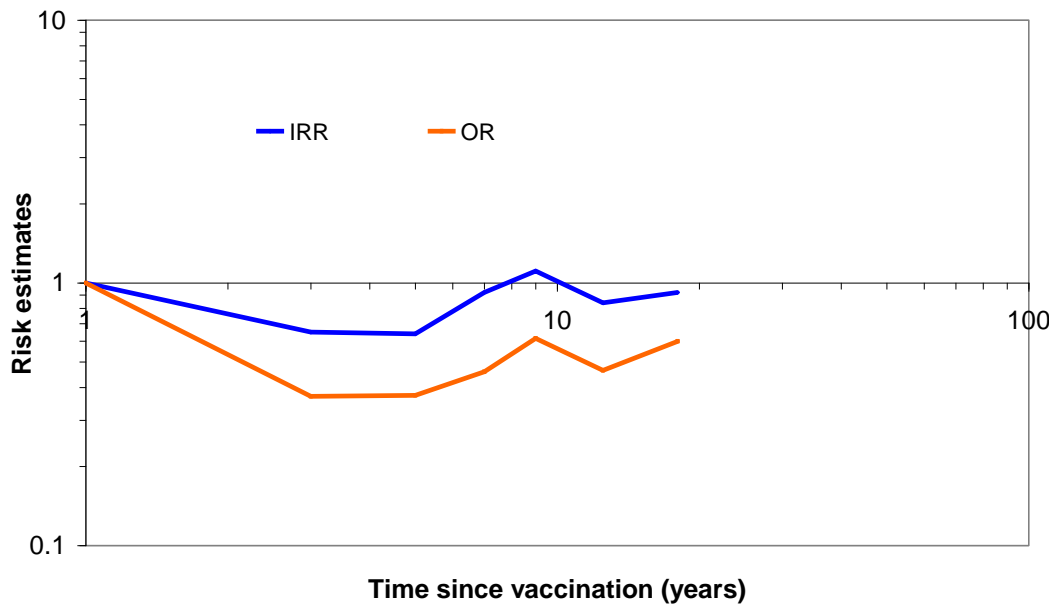


Figura 6

Stime di rischio di melanoma (incidence rate ratio, IRR; odds ratio, OR) per anni trascorsi dalla vaccinazione contro il virus della febbre gialla (scala logaritmica in entrambi gli assi).

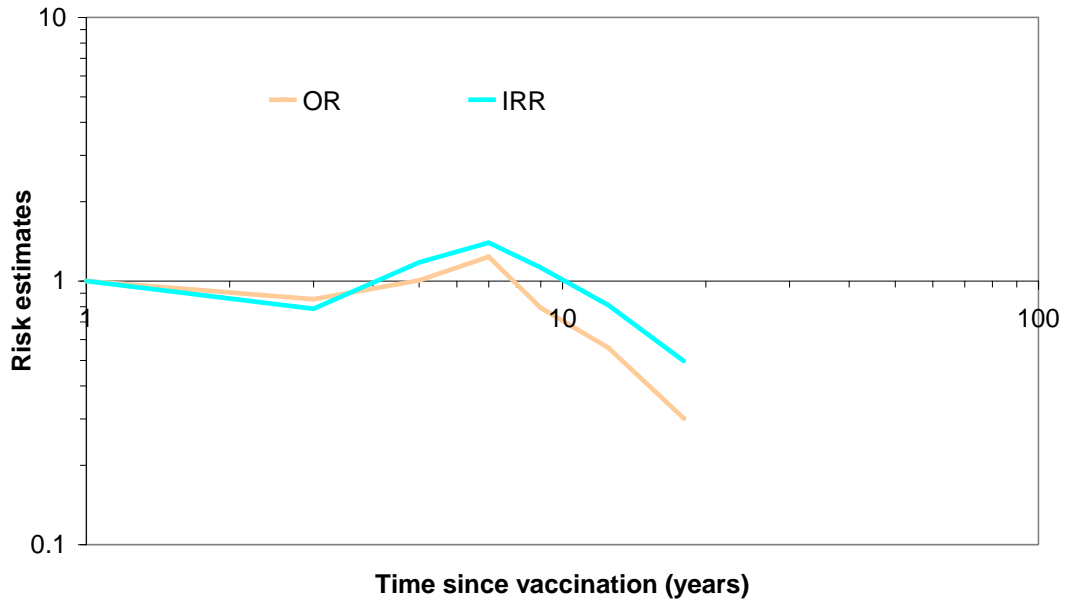


Figura 7

Causal Directed Acyclic Graph (DAG)

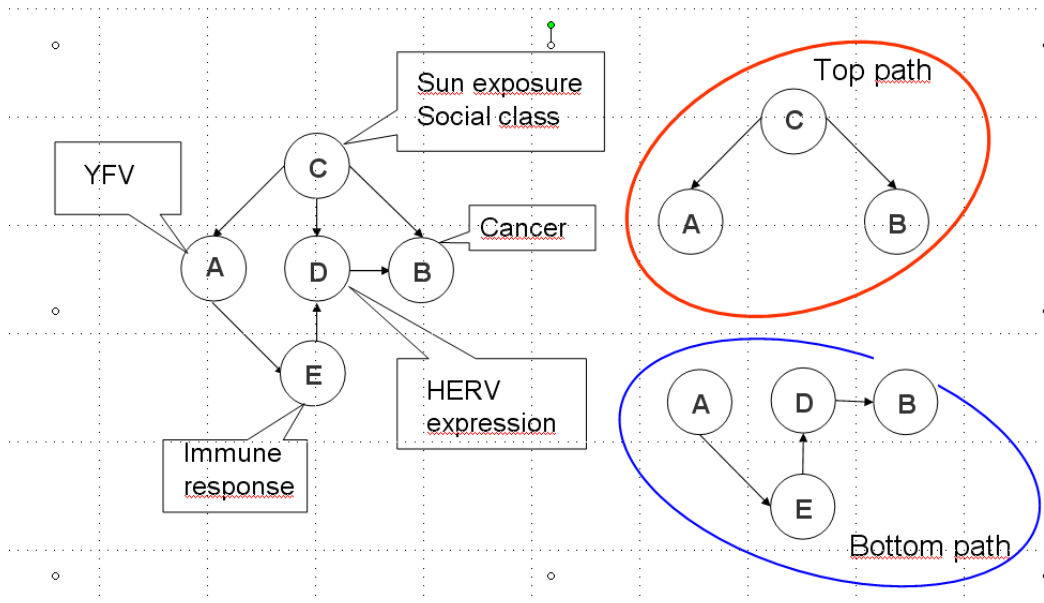


Figura 8

DAG #1 e #2 (per tumori che esprimono oppure no HERV-K)

