

Relazione del progetto di ricerca per Centro Interdipartimentale di ricerche sul cancro "Giorgio Prodi" CIRC – Università di Bologna

TITOLO: *Sviluppo e utilizzo di metodi alternativi (non – animal testing) nell'ambito del next generation risk assessment per l'identificazione di distruttori endocrini attivi nella cancerogenesi non genotossica*

Premessa

Questo progetto di ricerca si è quindi prefissato di valutare gli effetti tossici, di contaminanti ambientali quali gli interferenti endocrini. Inoltre, tramite la tecnologia del microarray, si è proposto di estrapolare profili di espressione genica a scopo identificativo, e per ottenere informazioni utili nella comprensione dei meccanismi di azione a livello molecolare di queste sostanze e delle loro interazioni. Obiettivo del presente studio è quello di indagare la modulazione di pathway genici che sostengono gli eventi associati alla oncotrasformazione in risposta ad esposizione a inquinanti ambientali ad attività endocrina e di identificare le concentrazioni correlate alla risposta adattiva dell'organismo. Nell'ambito di questo progetto i dati in vitro high-throughput verranno ottenuti mediante l'utilizzo di un nuovo test, denominato trasformica, che integra il saggio di trasformazione cellulare in vitro (CTA) con la trascrittomica (Mascolo et al., 2018).

Il saggio di trasformica (transformics assay) è stato sviluppato recentemente per fornire supporto ad una strategia sperimentale integrata per la cancerogenesi non genotossica (Corvi et al., 2017; Jacobs et al., 2016) . Il 3-metilcolantrene, composto genotossico capace di indurre trasformazione in vitro, è stato usato come composto prototipo per valutare la modulazione genica indotta da concentrazioni trasformanti o non trasformanti durante tappe critiche del processo di trasformazione cellulare in vitro (Mascolo et al., 2018). Il transformics assay può fornire informazioni sul modo di azione delle sostanze, identificando eventi chiave a livello molecolare e cellulare che portano alla trasformazione maligna come effetto avverso. Può, inoltre consentire di identificare la soglia di effetto, al di sotto della quale non si manifesta l'effetto avverso, come anche la dose che non ha effetto a livello trascrizionale (no observed transcriptionally effect level, (NOTEL) (Quercioli et al, 2017). L'informazione derivante dal transformics assay potrà essere integrata e supportata da test in vitro per la valutazione dell'attività di interferenza endocrina

Negli ultimi anni particolare attenzione è stata posta alle sostanze perfluoroalchiliche quali PFOS (acido perfluoroottansulfonico) e PFOA (acido perfluoroottanoico). Queste sostanze sono composti chimici, prodotti dall'uomo e non presenti naturalmente nell'ambiente, stabili, contenenti lunghe catene di carbonio e per questo impermeabili all'acqua e ai grassi. Tali sostanze perfluoroalchiliche, essendo chimicamente stabili nell'ambiente e resistenti ai tipici processi di degradazione risultano essere persistenti e presenti sia nel suolo, che nell'aria e nell'acqua. (EFSA, 2018). Le principali fonti di esposizione possono essere l'ingestione di acqua potabile contaminata o di cibi con alti livelli di questi composti. In studi effettuati su animali, si è visto che il principale organo bersaglio è il fegato (EFSA, 2018; Danish EPA, 2015). Queste sostanze chimiche possono accumularsi nell'organismo e occorrono perciò molti anni prima che l'organismo sia in grado di eliminarli. Un'elevata esposizione a PFOS e PFOA può avere conseguenze dannose per la salute, soprattutto a carico del fegato e in termini di disturbi dello sviluppo e probabilmente anche della riproduzione. Da alcuni esperimenti di laboratorio realizzati su ratti è emerso che questi due composti possono favorire l'insorgenza del cancro. L'azione cancerogena è legata a meccanismi non genotossici con soglia. Studi in vivo su ratto e topo hanno visto un aumento di tumori al fegato e pancreas. Nel fegato il

meccanismo è mediato dalla attivazione del recettore nucleare PPAR α e conseguente proliferazione dei perossisomi. E' noto che questo meccanismo non è rilevante per l'uomo (espressione del recettore e grado di attivazione molto limitate nel fegato umano); nel pancreas si ipotizza un meccanismo mediato dal recettore PPAR α .

Risultati

Lo studio ha visto l'impiego di linee cellulari di fibroblasti murini BALB/c 3T3 clone A31.1.1. La linea cellulare BALB/c 3T3 è costituita da cellule immortalizzate che non presentano peculiari caratteristiche tipiche delle cellule neoplastiche, ma sono in grado di acquisirle a seguito di un trattamento con sostanze cancerogene; vengono per questo utilizzate in test di trasformazione cellulare. Il test di trasformazione, che ha una buona correlazione con i test a lungo termine nell'animale, rappresenta un idoneo strumento per definire il profilo tossicologico e la possibile attività cancerogena di composti chimici, singoli o in miscele complesse. Tali cellule possono anche essere utilizzate come modello per la comprensione di alcuni meccanismi di cancerogenesi. Nel test di citotossicità si valuta l'efficienza clonale, ovvero il numero di colonie formatesi rispetto al numero di cellule seminate e l'efficienza clonale relativa, cioè l'efficienza clonale di un trattamento relativo al controllo solvente (Kakunaga, 1985; IARC/NCI/EPA 1985).

Nella prima fase del progetto sperimentale sono state scelte diverse dosi di concentrazioni comprese tra 200 g/ml e 20 g/ml del composto. In base ai risultati ottenuti nei test di citotossicità sono state selezionate le dosi di trattamento per il test di trasformazione.

In Figura 1 viene riportato lo schema sperimentale del test di trasformazione. Al fine di saggiare gli effetti citotossici e trasformanti di PFOA, dopo 24 ore dalla semina le cellule sono state esposte per 72 ore all'azione di varie dosi dei composti da testare. (Fig. 1).

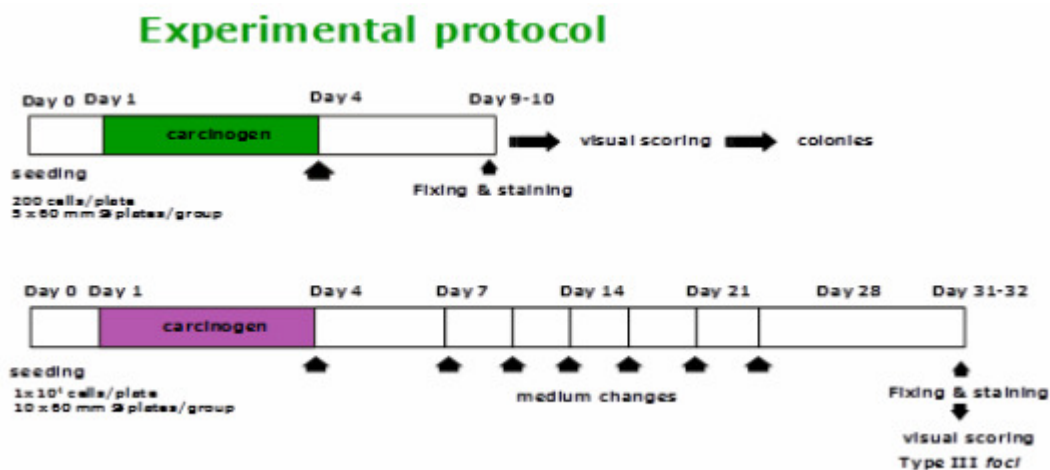


Figura 1: Protocollo sperimentale CTA con BALB/c 3T3

Per quanto riguarda i risultati del test di citotossicità si evidenzia un effetto citotossico per tutte le dosi di PFOA saggiate. Di seguito sono riportati i risultati in termini efficienza clonale assoluta (ECA) (Grafico 1).

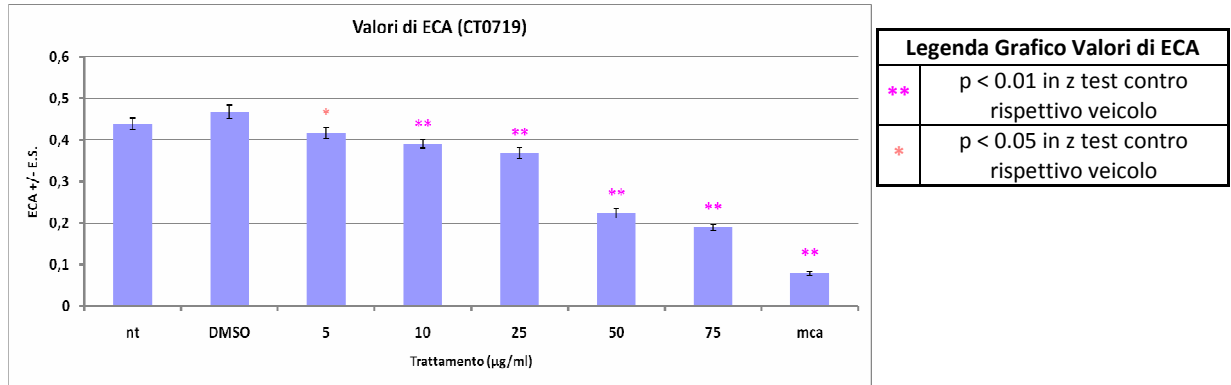


Grafico 1: Efficienza clonale relativa (ECA) PFOA

Di seguito sono riportati i risultati del CTA, espressi come frequenza di trasformazione (TF) (graf 2). Dai risultati ottenuti, si evince come il solo controllo positivo induce un effetto statisticamente significativo, per quanto riguarda le diverse concentrazioni di PFOA saggiate, nessuna risulta essere trasformante.

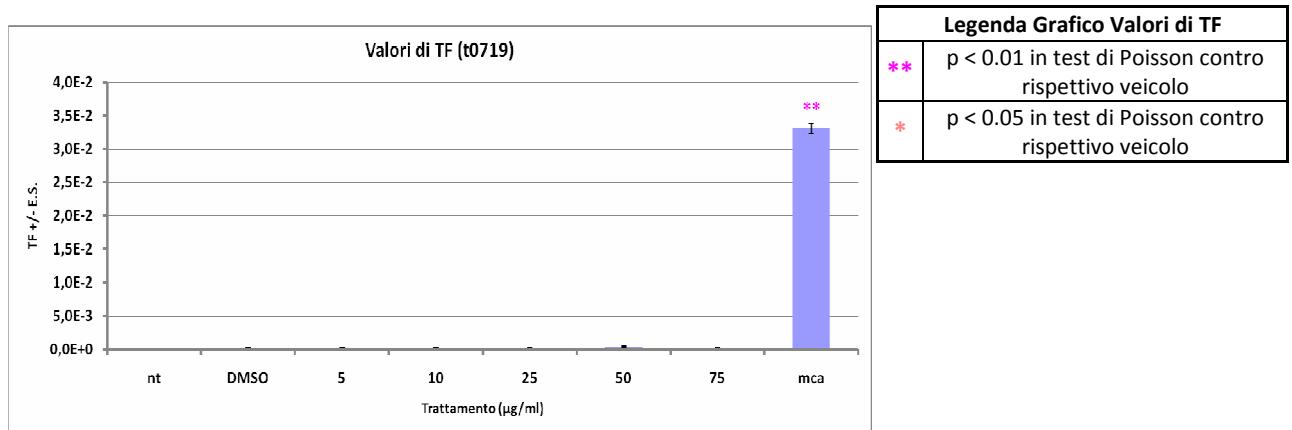


Grafico 2: Attività trasformante espressa come Frequenza di trasformazione (TF). ** p<0.01 vs controllo solvente, Poisson rates comparison.

I dati ottenuti con il test di trasformazione cellulare, potranno essere utilizzati nell'ambito del saggio di trasfomica.

Bibliografia

Corvi, R., Madia, F., Guyton, K.Z., Kasper, P., Rudel, R., Colacci, A., Kleinjans, J., and Jennings, P. (2017). Moving forward in carcinogenicity assessment: Report of an EURL ECVAM/ESTIV workshop. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 45, 278-286.

Danish Ministry of the Environment (2015) – Environmental Protection Agency : Perfluoroalkylated substances: PFOA, PFOS and PFOSA Evaluation of health hazard and proposal of a health based quality criterion for drinking water, soil and ground water. Environmental project No. 1665,

EFSA (2018) Risk to human health related to the presence of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid in food. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM);. doi: 10.2903/j.efsa.2018.5195

IARC/NCI/EPA Working Group, (1985). Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of transformation assays of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols. *Cancer Research*; 45:2395-2399

Jacobs, M.N., Colacci, A., Louekari, K., Luijten, M., Hakkert, B.C., Paparella, M., and Vasseur, P. (2016). International regulatory needs for development of an IATA for non-genotoxic carcinogenic chemical substances. *Altex* 33, 359-392

Kakunaga T, (1985). Critical review of the use of established cell lines for in vitro cell transformation, in Kakunaga, T. and Yamasaki, H. (Eds.), *Transformation assay of established cell lines: mechanisms and application*. IARC Scientific Publications 67, Lyon, 55-69

Mascolo, M.G., Perdichizzi, S., Vaccari, M., Rotondo, F., Zanzi, C., Grilli, S., Paparella, M., Jacobs, M.N., and Colacci, A. (2018). The transformics assay: first steps for the development of an integrated approach to investigate the malignant cell transformation in vitro. *Carcinogenesis* 39, 955-967

Quercioli, A., et al. (2018) The use of omics-based approaches in regulatory toxicology: an alternative approach to assess the no observed transcriptional effect level. *Microchemical Journal*, 136, 143-148.

Bologna, 27/02/ 2020

Dott.ssa Serra Stefania