

# VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ E GENOTOSSICITÀ INDOTTA *IN VIVO* NEL TOPO DA UN CONTAMINANTE ALIMENTARE: IL FURANO

Paola Leopardi Dittajuti

*Reparto Tossicologia genetica, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

## Introduzione

Il furano, un composto organico a struttura chimica eterociclica aromatica, lipofilo ed estremamente volatile, è presente in alcuni alimenti. La sua elevata attività epatotossica e cancerogena nel fegato di ratto e di topo, risultata negli studi di cancerogenesi condotti dal *National Toxicology Program* (NTP) nel 1993, ha indotto l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) a classificare il furano nel gruppo 2b come "possibile cancerogeno per l'uomo" (IARC, 1995). Nel 2004 la *Food and Drug Administration* (FDA) ha pubblicato dati relativi alla presenza di furano in un'ampia gamma di alimenti, in particolare in quelli conservati nei contenitori di vetro e di latta sterilizzati mediante il calore. Il furano si forma in seguito alla somministrazione di alte temperature ai fini della sterilizzazione, a partire da una serie di precursori chimici contenuti negli alimenti (acido ascorbico, carotenoidi e antociani, alcuni carboidrati e aminoacidi, oltre a numerosi acidi grassi polinsaturi). Nei cibi destinati alla primissima infanzia, in particolare, erano state messe in evidenza concentrazioni che superavano i 100 µg/kg di prodotto alimentare. Nello stesso anno, l'EFSA (*European Agency for Food Safety*) comunicava la necessità di ottenere ulteriori studi di tossicità e di esposizione ai fini di un corretto *risk assessment* sul furano (EFSA, 2004). La richiesta era basata sia sulla insufficienza di dati in vitro riferiti al meccanismo d'azione del furano, sia sulla considerazione che la maggior parte di dati in vivo erano contrastanti e inconclusivi per quanto riguardava la via di somministrazione e le dosi utilizzate. La stessa EFSA faceva inoltre rilevare che le dosi risultate cancerogene negli animali presentavano un margine di sicurezza ridotto, rispetto alle concentrazioni di furano relative alla esposizione umana.

Nell'ambito di un Progetto triennale (2007-2009) della Commissione Europea, dal titolo *Role of genetic and non-genetic mechanism in furan risk*, sono stati studiati da parte di gruppi di ricerca europei: le reazioni chimiche di formazione del furano, il metabolismo che segue all'attivazione enzimatica e l'assorbimento corporeo di furano, oltre ai meccanismi genotossici e non-genotossici implicati nella cancerogenesi, attraverso saggi sia in vivo nel topo e nel ratto, sia in vitro in varie cellule di mammifero in coltura.

## Studio *in vivo* nel topo

La potenziale attività tossica e genotossica del furano nel fegato del topo è stata valutata da parte del nostro gruppo di ricerca, attraverso uno studio sperimentale in vivo. Il furano, sciolto in olio di mais, è stato somministrato a topi maschi del ceppo B6C3F1 oralmente, per gavaggio, sia attraverso un trattamento ripetuto di 28 giorni a basse dosi, sia attraverso un'unica somministrazione per gavaggio a dosi acute relativamente elevate. Le dosi di furano selezionate

per il trattamento di 28 giorni, sono state le stesse che avevano indotto tumori al fegato nel topo nello studio dell'NTP -8 e 15 mg/kg di peso corporeo (pc)-, oltre a due dosi più basse, rilevanti per l'esposizione umana (2 e 4 mg/kg pc). Gli animali sono stati sacrificati 24 ore dopo l'ultimo trattamento. Per l'unica somministrazione orale del trattamento acuto sono state selezionate tre alte dosi: 15, 100 e 250 mg/kg pc, sulla base dei dati di tossicità esistenti in letteratura. In questo caso, gli animali sono stati sacrificati 3 ore dopo la fine del trattamento.

Gli effetti di tossicità sistemica, indotti in seguito a somministrazione orale ripetuta, sono stati messi in relazione con la variazione sia del peso corporeo sia del peso di una serie di organi (fegato, milza, ecc), negli animali trattati rispetto ai controlli, somministrati in parallelo con il solo solvente.

Per valutare il potenziale genotossico del furano sono state applicate sia tecniche di citogenetica classica e molecolare (micronucleo e saggio della cometa), sia metodiche di biologia molecolare (*gene-array*). Al tempo stesso, la tossicità del composto è stata studiata attraverso l'analisi di alterazioni istologiche e di marcatori specifici della proliferazione cellulare e dell'apoptosi, su sezioni di tessuto.

Sebbene un insieme consistente di dati della letteratura ponga in evidenza l'attività in generale non-genotossica del furano, un ruolo parziale della sua attività genotossica è dimostrata da una parte più esigua, ma non meno rilevante, di risultati. A questo proposito, i dati di alcuni Autori riportano che un metabolita-chiave assai reattivo, il *cis*-2-butene-1,4-dial, prodotto dopo attivazione metabolica del furano, attraverso il CYP 2E1 del citocromo P450, è in grado di legarsi alle proteine e ai nucleosidi del DNA (Burka *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1995; Byrns *et al.*, 2002). Sono questi legami che, attraverso l'induzione di addotti covalenti con adenosina, citosina e guanosina del DNA, generano i cosiddetti *crosslink* DNA-DNA e DNA-proteine. Questi ultimi rappresenterebbero la lesione citotossica e genotossica vera e propria indotta dal furano (Byrns *et al.*, 2004; Byrns *et al.*, 2006; Peterson, 2006). L'attivazione metabolica del furano avviene principalmente a livello del fegato, l'organo che assorbe la maggiore quantità di furano corporeo (Burka *et al.*, 1991), in cui si forma il metabolita attivo (Chen *et al.*, 1995).

## Trattamento ripetuto a basse dosi

Essendo il fegato anche l'organo bersaglio della cancerogenesi nel topo (NTP, 1993), abbiamo concentrato il nostro studio sulla valutazione degli effetti tossici e genotossici del trattamento con furano sugli epatociti isolati di fresco e sulle sezioni paraffinate del fegato degli animali, dopo trattamento per gavaggio di quattro settimane a basse dosi di furano (2, 4, 8 e 15 mg/kg di pc), sciolte in olio di mais.

Il livello di proliferazione indotto è stato analizzato valutando la percentuale di epatociti che presentavano incorporazione di 2-Bromo-5deossi-Uridina (BrdU, somministrata agli animali nelle ultime 24 ore di vita), corrispondente ad una marcatura con colorante fast red.

Il livello di apoptosi indotto dal trattamento è stato messo in evidenza mediante la tecnica del TUNEL, applicata a sezioni di tessuto di fegato, in cui vengono considerate "morte" quelle cellule che mostrano una marcatura specifica con fluorocromo (nel nostro caso, fluoresceina). In queste stesse sezioni di tessuto è stata analizzata anche la presenza di eventuali alterazioni istopatologiche, dopo colorazione con ematossilina-eosina.

L'eventuale presenza di un danno indotto al DNA dal trattamento con furano è stato studiato direttamente negli epatociti isolati dal fegato degli animali sacrificati, sia mediante il saggio della cometa in ambiente alcalino, sia utilizzando un test che analizza, con tecniche di immunofluorescenza, l'eventuale marcatura con anticorpo per l'istone fosforilato H2A. Queste due metodologie mettono in evidenza la presenza di uno stesso tipo di danno al DNA, sottoforma di rotture del filamento.

Per finire, il DNA degli epatociti degli animali trattati cronicamente con la dose più alta (15 mg/kg pc) è stato isolato e analizzato mediante la tecnica molecolare dei *gene-arrays*, che utilizza la *real-time Polymerase Chain Reaction* (rt-PCR) per valutare la presenza di eventuali cambiamenti nel livello di espressione genica di geni che sono considerati rilevanti per lo studio dei meccanismi di genotossicità e di cancerogenesi.

In parallelo allo studio sul fegato degli animali sacrificati, abbiamo preso in considerazione anche le cellule della milza, un organo che è in stretta relazione con il fegato attraverso la vena porta. Dalla milza sono stati isolati i linfociti, cellule che sono in grado di proliferare in coltura dopo opportuna stimolazione con Concanavalina A, allo scopo di analizzare gli effetti del trattamento con le basse dosi ripetute di furano, durante un ciclo cellulare completo. Abbiamo potuto applicare, oltre al saggio di genotossicità che analizza la frequenza di foci fosforilati dell'istone H2A, anche il test del micronucleo, un saggio che permette di mettere in evidenza, dopo 48 ore di coltura, la presenza di micronuclei nel citoplasma cellulare di cellule binucleate, bloccate alla citocinesi mediante trattamento con citocalasina B.

I micronuclei, costituiti di materiale nucleare che non riesce a segregare correttamente nel nucleo delle cellule figlie e quindi rimane escluso dal nucleo, rappresentano un indicatore ormai ben validato di danno al DNA, sia clastogeno (in presenza di frammenti privi di centromero, dovuta all'induzione di rotture nel filamento di DNA), sia aneuploidizzante (in presenza di interi cromosomi, dovuta a difetti nella segregazione dei cromosomi o del fuso mitotico).

## Trattamento acuto

Per finire gli effetti tossici e genotossici nel fegato, indotti dopo un trattamento unico, acuto, di 3 ore, con somministrazione per gavaggio di tre alte dosi di furano (15, 100 e 250 mg/kg pc), sono stati valutati attraverso l'analisi dei parametri istopatologici sulle sezioni di fegato e mediante il saggio della cometa in ambiente alcalino sugli epatociti isolati di fresco. Quest'ultimo test è stato eseguito utilizzando anche un saggio modificato, che fa uso di un trattamento con raggi  $\gamma$  (4 Gy), per l'analisi dell'eventuale presenza di *crosslink* sul DNA.

## Risultati

### Trattamento ripetuto a basse dosi nel fegato

Mentre in seguito a somministrazione ripetuta di basse dosi di furano, il peso corporeo degli animali non presentava, a fine trattamento, alcuna differenza significativa rispetto al peso corporeo degli animali somministrati con olio di mais; al contrario, il peso del fegato, negli animali somministrati con la dose di 4 mg/kg pc, era significativamente aumentato rispetto a quello dei controlli, per un effetto evidente di iperplasia legata al trattamento con furano. Alterazioni istopatologiche sono state messe in evidenza alle due dosi più elevate (8 e 15 mg/kg pc).

Nel fegato degli animali trattati con queste dosi si osservavano zone di necrosi del parenchima, identificate attraverso la presenza di cellule con citoplasmi eosinofili e nuclei ipercromici. Negli epatociti isolati dagli stessi animali è stato osservato un aumento significativo di cellule in attiva proliferazione, marcate con fast red. Sulle sezioni di tessuto, invece, un aumento significativo di cellule apoptotiche è stato messo in evidenza solo negli animali trattati con la dose più alta di furano (15 mg/kg pc).

Nessuno dei saggi classici di genotossicità, invece, ha permesso di rilevare alcun danno al DNA nel fegato, dopo trattamento ripetuto a basse dosi di furano.

Contrariamente a questi dati, i risultati ottenuti con gli *arrays* sui campioni di fegato degli animali trattati ripetutamente con 15 mg/kg pc, una dose risultata cancerogena negli studi dell'NTP (1993) mostrano, da una parte l'induzione di un effetto tossico, sottoforma sia di una over-espressione dei geni della proliferazione cellulare e della risposta infiammatoria primaria (attivazione dei macrofagi), oltre che di una over-espressione di geni dello stress ossidativo e della produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), rispetto ai campioni dei controlli corrispondenti. Dall'altra parte, l'analisi di 84 geni implicati nella risposta al danno al DNA, ha messo in luce, a quella stessa dose, una over-espressione di geni coinvolti nell'arresto del ciclo cellulare (Chck1 e Chck2), della riparazione omologa (Rad51c e Rad51/1), della riparazione per BER (Xrcc1) e della *Tran-lesion synthesis* (Polk), significativamente maggiore (di 2 volte), rispetto ai campioni dei controlli abbinati.

### Trattamento ripetuto a basse dosi nella milza

In seguito a trattamento ripetuto a basse dosi di furano, nelle cellule isolate dalla milza, coltivate *in vitro*, è stato osservato un aumento significativo di foci fosforilati dell'istone H2A nelle cellule degli animali trattati sia con 8 mg/kg pc ( $p<0,01$ ), sia con 15 mg/kg pc ( $p<0,001$ ) (Tabella 1). L'aumento era in chiara relazione con la fase S di replicazione del DNA, visto che nei linfociti non proliferanti il numero di foci fosforilati era simile in animali trattati e di controllo.

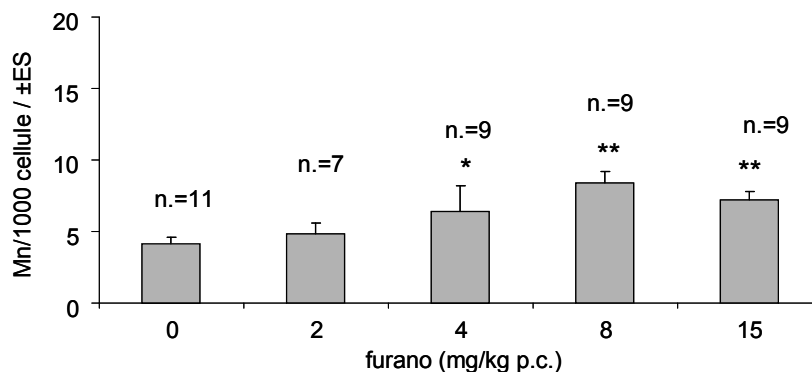
**Tabella 1. Risultati del saggio a immunofluorescenza per l'analisi dei foci  $\gamma$ -H2AX negli splenociti di topi trattati per gavaggio con basse dosi ripetute di furano, per 28 giorni**

| Furano<br>mg/kg pc      | Topi<br>n. | Foci $\gamma$ -H2AX (%) <sup>a</sup> ± ES |          |             |
|-------------------------|------------|-------------------------------------------|----------|-------------|
|                         |            | 0                                         | <10      | ≥10         |
| In cellule quiescenti   |            |                                           |          |             |
| 0                       | 9          | 79,0±3,3                                  | 21,0±3,3 | 0           |
| 4                       | 7          | 83,1±1,6                                  | 16,8±1,8 | 0,1±0,1     |
| 8                       | 6          | 84,1±3,4                                  | 15,9±3,4 | 0           |
| 15                      | 6          | 79,9±7,7                                  | 20,0±7,3 | 0,1±0,1     |
| In cellule proliferanti |            |                                           |          |             |
| 0                       | 9          | 83,5±2,6                                  | 12,9±1,7 | 3,6±1,2     |
| 4                       | 7          | 84,9±2,6                                  | 14,5±2,6 | 0,6±0,03    |
| 8                       | 6          | 74,6±1,8*                                 | 16,0±1.4 | 9,4±1,1**   |
| 15                      | 6          | 68,9±11,2**                               | 11,4±0,7 | 19,7±4,7*** |

\* =  $p<0,05$ ; \*\* =  $p<0,001$  \*\*\* =  $p<0,0005$  (*t test di Student*).

ES: Errore Standard

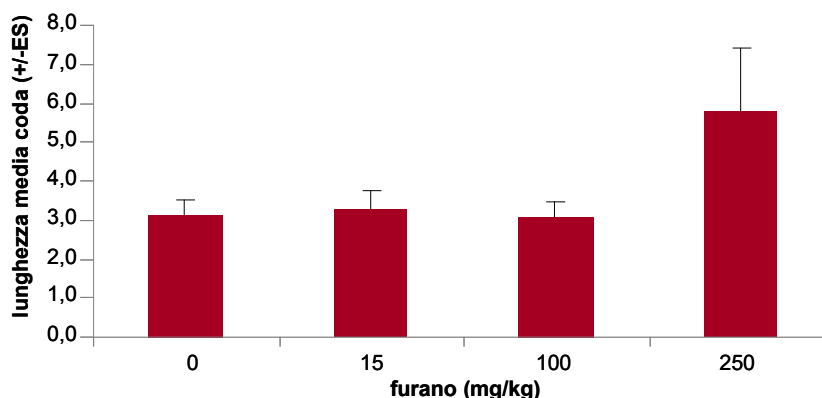
Inoltre, un aumento statisticamente rilevante della frequenza di micronuclei indotti dopo 48 ore di coltura è stato osservato già nelle cellule degli animali trattati con 4 mg/kg pc di furano ( $p<0,05$ ), oltre che nei linfociti di quelli somministrati con le dosi 8 e 15 mg/kg pc ( $p<0,005$ ) (Figura 1).



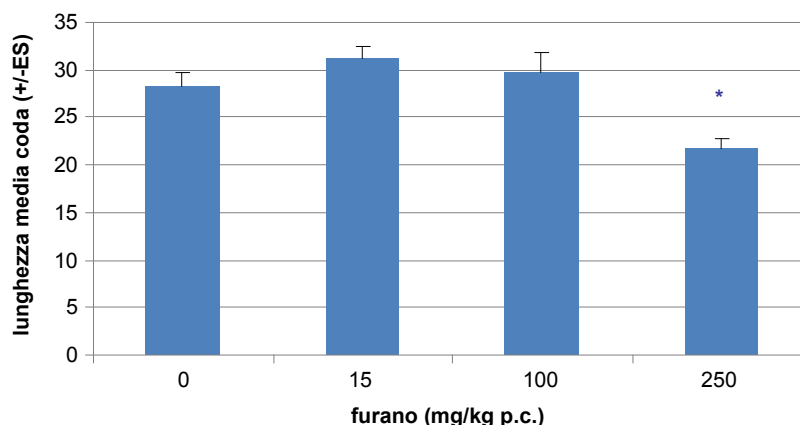
**Figura 1. Risultati del test del micronucleo negli splenociti di topi trattati per gavaggio con basse dosi ripetute di furano, per 28 giorni. Le colonne rappresentano i valori medi di ogni gruppo; \* =  $p<0,05$ ; \*\* =  $p<0,005$  (t test di Student). (n = numero topi)**

### Trattamento acuto nel fegato

La somministrazione orale di alte dosi di furano (100 e 250 mg/kg pc) ha indotto nel fegato chiari segni di tossicità. Gli animali sono sopravvissuti al trattamento, tuttavia l'analisi delle lesioni istopatologiche sulle sezioni di tessuto, dopo colorazione con ematossilina-eosina, ha mostrato la presenza di alterazioni diffuse del parenchima, con aree di necrosi e di steatosi, associata in particolare alla dose più alta di trattamento (250 mg/kg pc). Negli epatociti dei topi trattati con la stessa dose di furano, la presenza di danno al DNA, analizzata con il saggio della cometa, ha messo in evidenza un aumento significativo ( $p<0,05$ ) del parametro principale di riferimento (lunghezza della coda della cometa), che sta ad indicare la presenza di rotture a singolo filamento e di siti alcali-labili indotti dal trattamento (Figura 2). Nel saggio modificato, un trattamento preventivo con raggi  $\gamma$  ha indotto negli epatociti dei topi trattati con la dose più alta di furano (250 mg/kg pc) una diminuzione significativa ( $p<0,05$ ) della migrazione di DNA nella coda (Figura 3).



**Figura 2. Risultati del saggio della cometa in condizioni alcaline negli epatociti di topi trattati con una singola somministrazione orale di furano, raccolti 3 ore dopo la fine del trattamento. Le colonne rappresentano i valori medi di 5 animali; \* =  $p<0,05$  (t test di Student)**



**Figura 3. Protocollo del saggio della cometa (protocollo modificato – trattamento con raggi  $\gamma$ ) negli epatociti di topi trattati con una singola somministrazione orale di furano.**  
 Le colonne rappresentano i valori medi di 5 animali;  $\pm$  = valori medi  $\pm$  ES rispetto ai controlli.  
 \* =  $p < 0,05$  (t test di Student)

## Conclusioni

L'analisi degli effetti genotossici indotti nelle cellule della milza è stata utile per chiarire il meccanismo di formazione del danno al DNA indotto da basse dosi ripetute di furano. Già valutando gli effetti indotti nei linfociti dalla dose di 8 mg/kg pc, mediante l'analisi della frequenza di siti per il  $\gamma$ H2AX, è stato osservato un effetto positivo, legato al trattamento. Poiché questo effetto clastogeno del furano, relativo alla presenza di siti  $\gamma$ H2AX significativamente aumentati, si esplicava esclusivamente nei linfociti in attiva proliferazione, non nelle cellule quiescenti, abbiamo ipotizzato che, nei linfociti che si trovavano intorno alla fase S del loro ciclo cellulare, la forza di replicazione avesse introdotto delle rotture sul filamento di DNA, nei siti in cui aveva incontrato dei *crosslink*, allo scopo di mandare avanti la replicazione del DNA. In una fase seguente, nelle cellule binucleate appena divise, abbiamo osservato un aumento significativo di micronuclei, oltre che nelle cellule dei topi trattati con le stesse dosi positive per l'aumento di foci del  $\gamma$ H2AX, già anche ad una dose relativamente bassa di furano (4 mg/kg pc). Abbiamo supposto, per concludere, che i micronuclei rappresentassero la conseguenza proprio di quelle rotture al DNA introdotte durante la fase S, trasformate in rotture a doppio filamento dopo la sintesi (Leopardi *et al.*, 2010). L'effetto clastogeno, nelle cellule della milza, può essere messo in relazione con la conversione del furano nel suo metabolita attivo, il cis-2-butene-1,4-dial (Chen *et al.*, 1995; Byrns *et al.*, 2002). Quest'ultimo può formare addotti covalenti con i nucleosidi del DNA, che hanno il potenziale di formare *crosslink* DNA-DNA e DNA-proteine (Byrns *et al.*, 2004; Byrns *et al.*, 2006; Peterson, 2006).

I risultati del nostro studio indicano che la somministrazione ripetuta, per 28 giorni, di dosi relativamente basse di furano, comprese le due dosi cancerogene negli studi dell'NTP, ha causato una debole tossicità nel fegato dei topi, con l'induzione di un livello di proliferazione cellulare evidenziabile con i nostri mezzi, ma sporadica, perché mirata alla sostituzione delle cellule morte (apoptotiche), anch'esse evidenziabili solo alla dose più alta di furano (15 mg/kg pc). La valutazione degli effetti genotossici, dall'altro lato, ha messo in evidenza che un aumento significativo di danno al DNA era evidente solo nel fegato dei topi trattati con una

dose molto alta e tossica di furano (250 mg/kg pc). Il saggio modificato, in particolare, ha spiegato che il danno consisteva effettivamente nella presenza di *crosslink* sul DNA. Al contrario, nelle cellule del fegato non sono stati osservati effetti genotossici, indotti dal trattamento, nei topi somministrati per 28 giorni a basse dosi di furano, né mediante il saggio della cometa, né attraverso l'analisi dei foci fosforilati dell'H2AX ( $\gamma$ H2AX). Questi dati, devono tuttavia essere interpretati con cautela, tenendo conto che, nelle cellule della milza degli stessi topi, gli effetti genotossici sono stati messi in evidenza solo nei linfociti in attiva proliferazione. Quindi, i risultati negativi potrebbero essere messi in relazione con il livello relativamente basso di proliferazione degli epatociti, indotto dalle basse dosi di furano somministrate cronicamente. Purtroppo, l'analisi dell'espressione genica sul DNA del fegato di topi trattati con la dose cancerogena di 15 mg/kg pc, somministrata per 4 settimane, ha messo in luce la presenza di geni over-espressi, coinvolti sia nel processo di danno ossidativo e infiammazione, sia nella riparazione del DNA per escissione di basi (BER), riparazione omologa (HR) e *Trans-lesion synthesis* (TLS) (Cordelli *et al.*, 2010).

In conclusione, anche se possiamo confermare che, nell'organo target, un meccanismo relativo alla proliferazione cellulare – e quindi non-genotossico – sia coinvolto nel processo di cancerogenesi indotto dal furano, il contributo di un'evidenza non-diretta di genotossicità, come dimostrato dai nostri risultati dei *gene array*, non dovrebbe comunque essere sottovalutato.

## Ringraziamenti

Questo studio è stato finanziato con i fondi del Progetto Europeo “Furan-RA”(SSPE-CT-2006-44393). Si ringraziano per la collaborazione: Riccardo Crebelli (direttore del Reparto Tossicologia genetica) quale responsabile scientifico del Sottoprogetto Europeo, Francesca Marcon ed Ester Siniscalchi (Reparto Tossicologia genetica), Paola Villani ed Eugenia Cordelli (Sezione di Tossicologia e Scienze biomediche, ENEA-Casaccia), Stefania Caiola (Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare) per aver collaborato ai vari saggi di genotossicità in vivo, Fiorella Malchiodi-Albedi (Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze) e Caterina Macri (Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare) per aver curato la parte istologica, Luigi Conti (Reparto Tossicologia genetica) e Gabriele Deluca (Reparto Cancerogenesi chimica e computazionale) per essersi dedicati alla cura e al trattamento degli animali.

## Bibliografia

- Burka LT, Washburn KD, Irwin RD. Disposition of [ $^{14}$ C] furan in the male F344 rat. *J Toxicol Environ Health* 1991;34:245-57.
- Byrns MC, Predecki DP, Peterson LA. Characterization of nucleoside adducts of cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. *Chem Res Toxicol* 2002 15(3):373-79.
- Byrns MC, Vu CC, Peterson LA. The formation of substituted 1, N6-etheno-2'-deoxyadenosine and 1, N2-etheno-2'-deoxyguanosine adducts by cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. *Chem Res Toxicol* 2004 17(12):1607-13.
- Byrns MC, Vu CC, Neidigh JW, Abad JL, Jones RA, Peterson LA. Detection of DNA adducts derived from the reactive metabolite of furan, cis-2-butene-1,4-dial. *Chem Res Toxicol*. 2006, 19(3):414-20.
- Chen L-J, Hecht SS, Peterson LA. Identification of cis-2-Butene-1,4-dial as microsomal metabolite of Furan. *Chem Res Toxicol* 1995 8(7):903-06.
- Cordelli E, Leopardi P, Villani P, Marcon F, Macri C, Caiola S, Siniscalchi E, Conti L, Eleuteri P, Malchiodi-Albedi F, Crebelli R. Toxic and genotoxic effects of oral administration of furan in mouse liver. *Mutagenesis* 2010 25(3):305-14.

- European Food Safety Authority. Report of the scientific panel on contaminants in the food chain on provisional findings on furan in food. *EFSA J* 2004;137:1-20.
- Leopardi P, Cordelli E, Villani P, Cremona TP, Conti L, De Luca G, Crebelli R. Assessment of in vivo genotoxicity of the rodent carcinogen furan: evaluation of DNA damage and induction of micronuclei in mouse splenocytes. *Mutagenesis* 2010, 25(1):57-62.
- NTP (National Toxicology Program). *Toxicology and Carcinogenesis Studies of Furan (CAS No. 110-00-9) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies)*. Research Triangle Park, NC, USA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health; 1993. (NTP Technical Report No. 402).
- Peterson LA. Electrophilic intermediates produced by bioactivation of furan. *Drug Metab Rev* 2006;38(4):615-26.