

IL RUOLO DEI TEST A BREVE TERMINE NELLA SPERIMENTAZIONE TOSSICOLOGICA

R. Crebelli

Istituto Superiore di Sanità

Roma

INTRODUZIONE

Mutagenesi e cancerogenesi chimica sono rimaste discipline essenzialmente separate fino all'inizio degli anni '70. La mutagenesi chimica si era infatti sviluppata negli anni '40-'50 come branca della genetica con finalità prevalentemente applicative, quali la produzione di varianti genetiche utili in agricoltura e zootecnia. Nella incipiente era nucleare, in cui era vivo il timore dei danni genetici provocati dalle radiazioni, la scoperta di sostanze chimiche ("supermutageni") di gran lunga più efficienti come mutageni rispetto alle radiazioni ionizzanti suggerì tuttavia di considerare con la dovuta attenzione anche il rischio di danni genetici dovuti alla crescente esposizione umana a prodotti chimici di sintesi. Fu così creato un registro dei mutageni chimici ed iniziati i primi pionieristici tentativi di monitorare l'esposizione umana ad agenti genotossici, soprattutto per merito del ricercatore svedese Lars Ehrenberg. L'attività mutagena fu tuttavia associata alle proprietà cancerogene delle sostanze chimiche solo all'inizio degli anni '70, quando Bruce Ames dimostrò l'attività mutagena di una serie di cancerogeni chimici in un test *in vitro* sul batterio Salmonella typhimurium (1). A questo lavoro seguì la pubblicazione dei risultati di uno studio collaborativo che dimostrava in un gruppo eterogeneo di 300 sostanze chimiche una correlazione di circa il 90% tra attività mutagena in Salmonella e proprietà cancerogene nei roditori (2). Questi studi, prospettando la possibilità di predire l'attività cancerogena in base alla risposta in test *in vitro* di relativa semplicità ed economia, suscitarono un enorme interesse ed aprirono la strada allo sviluppo ed alla applicazione routinaria dei saggi a breve termine (STT, short-term tests).

Attualmente nel file dell'Environmental Mutagen Information Center sono raccolti i dati relativi ad oltre 20.000 sostanze chimiche e nuovi dati vengono continuamente presentati nella letteratura scientifica. In questi anni inoltre è stato sviluppato un numero elevato, anche eccessivo, di test a breve termine diversi per organismo, procedure sperimentali e/o end-point studiato. Una rassegna pubblicata alcuni anni fa (3) già descriveva oltre 100 STT su organismi procarioti ed eucarioti.

Tutto ciò si è riflesso anche al di fuori della comunità scientifica, con l'adozione di batterie di STT per la valutazione della attività mutagena e la predizione degli effetti cancerogeni per fini normativi. L'idea proposta originariamente 15 anni fa di utilizzare

i test a breve termine per la predizione dell'attività cancerogena ha quindi trovato ampio riscontro ed ha esercitato una profonda influenza nella sperimentazione tossicologica.

Il paradigma che per oltre una decade ha giustificato l'uso degli STT per la predizione della cancerogenesi, cioè "i cancerogeni sono mutageni, quindi i mutageni sono cancerogeni" ha trovato recentemente importante supporto teorico nelle scoperte della oncologia molecolare, con la dimostrazione del ruolo critico di eventi mutazionali in alcune fasi dello sviluppo neoplastico, ma anche parziali smentite nei fatti. In particolare due recenti studi in cui è stata analizzata la correlazione tra attività mutagena e proprietà cancerogene delle sostanze studiate in saggi a lungo termine dal National Cancer Institute (NCI) e National Toxicology Program (NTP) hanno messo in dubbio la realtà di questa correlazione ed aperto un vivo dibattito sulle potenzialità ed il ruolo degli STT nella sperimentazione tossicologica.

Zeiger (4) ha esaminato la relazione tra proprietà cancerogene nei roditori ed attività mutagena in S.typhimurium per 224 sostanze studiate da NCI/NTP, osservando una concordanza di risposte nel 58% dei casi.

Tennant et al. (5) hanno determinato l'attività mutagena di 73 sostanze già studiate da NCI/NTP utilizzando 4 STT in vitro, mostrando una concordanza di risultati tra STT e cancerogenesi di circa il 60% .

Sono stati appunto questi bassi valori di correlazione tra attività mutagena e cancerogena, ben lontani dal 90-95% delle prime stime, a mettere in discussione l'utilità degli STT per la predizione degli effetti cancerogeni. In realtà i risultati di questi studi devono essere valutati alla luce di alcune considerazioni che li collocano in una più corretta prospettiva.

Relativamente all'analisi di Zeiger (cancerogenesi vs mutagenesi in Salmonella) si può osservare che, sebbene l'assenza di risposta mutagena non sia di per sé indicativa di non cancerogenicità (58% dei non mutageni sono cancerogeni), una risposta mutagena positiva risulta predittiva del potere cancerogeno nel 77% dei casi. Questa capacità predittiva, pur lontana dal 100% ingenuamente perseguito negli anni '70, deve essere considerata operativamente più che soddisfacente, soprattutto quando si consideri che nello stesso set di sostanze la concordanza di risposta cancerogena tra due specie affini come ratto e topo è solamente del 71%, e che quindi l'attività cancerogena in una specie è predittiva della cancerogenesi per l'altra solo nel 71% dei casi. Inoltre bisogna considerare che ogni stima di correlazione tra attività mutagena e cancerogena risente di un bias dovuto alla presenza nel campione di sostanze considerato di composti di classi chimiche diverse in variabile ed arbitraria proporzione. Ciò è tanto più importante quando si consideri che l'accuratezza con cui la risposta mutagena predice l'attività cancerogena varia da valori prossimi al 100% (nitroaromatici) ad appena il 40% (polialogenati). Ovviamente, non potendosi approntare un campione di sostanze rappresentativo dell'universo di tutti i cancerogeni (in quanto ignoti), la selezione delle

sostanze implica necessariamente una distorsione della situazione reale. Una possibile spiegazione per la discordanza tra le prime e le più recenti stime relative alle predittività degli STT è anche data dalla evoluzione degli studi a lungo termine che si è avuta negli ultimi lustri. Fino all'inizio degli anni '70 infatti gli studi di cancerogenesi erano di breve durata e di scarsa sensibilità, idonei ad individuare solo potenti cancerogeni. Inoltre le sostanze studiate venivano scelte prevalentemente sulla base di criteri di struttura-attività, privilegiando quelle le cui caratteristiche strutturali suggerivano una possibile attività. Ciò ha portato inizialmente a concentrare gli studi su agenti elettrofili direttamente reattivi o tali dopo conversione metabolica. Solo successivamente, quando furono adottati protocolli sperimentali che prevedevano la somministrazione per tutta la vita fino alla dose massima tollerata a due specie e due sessi, si è resa possibile l'individuazione di cancerogeni di debole potenza o sesso/specie specifici. Contemporaneamente sono stati modificati anche i criteri di selezione delle sostanze, dando priorità a quelle di ampia diffusione e/o impatto ambientale (come molti pesticidi alogenati), indipendentemente da considerazioni di struttura-attività.

Queste considerazioni si applicano anche all'analisi di Tennant e collaboratori (cancerogenesi *vs* mutagenesi in 4 STT *in vitro*) da cui emerge una ulteriore indicazione di particolare interesse, cioè la non complementarietà tra le risposte dei 4 test. Nonostante individuino un range di end-points diversi su tre tipi cellulari, i 4 STT hanno infatti mostrato un sostanziale accordo, tale che sulla base dei risultati ottenuti nessuna batteria di test costruita a posteriori risulta significativamente più predittiva del solo test su *Salmonella*. Ovviamente ciò mette in serio dubbio la logica con cui in questi anni sono state elaborate batterie di saggi più o meno articolate che hanno trovato spesso un riscontro anche a livello normativo.

Presunta scarsa predittività, ridondanza, non complementarietà ed inadeguatezza delle attuali batterie di saggi hanno quindi acceso recentemente il dibattito attorno agli STT. Appare quindi opportuno a questo punto riconsiderare brevemente il ruolo ed il significato degli STT sulla base delle attuali conoscenze, prendendo spunto dalle indicazioni della International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens (ICPEMC) (6).

ATTIVITA' MUTAGENA IN VIVO

Un primo principio di fondamentale importanza da ribadire è quello di considerare l'attività mutagena *in vivo* come una informazione di grande rilevanza tossicologica, anche indipendentemente dalla possibile correlazione con la cancerogenesi. L'effetto sul *carico genetico* umano, la possibile implicazione di eventi mutageni in altri processi degenerativi (arteriosclerosi, invecchiamento), oltre alla non perfetta predittività dei test a lungo termine su roditori, impongono di considerare gli agenti che mostrano inequivocabile attività mutagena in STT *in vivo* come potenzialmente pericolosi per l'uomo, anche in assenza di altre informazioni o in presenza di dati di cancerogenesi discordanti (per quanto non siano ancora note sostanze mutagene *in vivo* per cui sia stata dimostrata la non cancerogenicità in adeguati studi a lungo termine).

BATTERIE DI STT IN VITRO

Le attuali batterie di STT in vitro sono articolate su saggi capaci di individuare una gamma di end-points genetici diversi (mutazione genica, aberrazioni cromosomiche strutturali e numeriche, ricombinazione, scambi tra cromatidi fratelli, riparo) con scarsa attenzione alle caratteristiche metaboliche dei sistemi biologici utilizzati. L'analisi di larghe basi di dati (7, 5) dimostra tuttavia ridondanza e scarsa complementarità tra saggi per eventi genetici diversi oltre ad imprevedibili associazioni. La variabile più importante in queste batterie risulta infatti essere offerta dalla varietà di situazioni metaboliche piuttosto che dalla molteplicità degli end-points. A questo proposito è stata per esempio recentemente dibattuta l'opportunità di mantenere nelle batterie di STT in vitro i saggi di mutazione su colture cellulari, vista la sovrapposizione nella performance con i test citogenetici in vitro. Per il futuro la strategia da adottare sembra quindi quella di ridurre il numero di saggi ampliando la varietà di condizioni metaboliche e sistemi di attivazione. Tutto ciò va tenuto in giusta considerazione nel valutare l'apparente contraddittorietà di risultati che accade di osservare tra saggi apparentemente equivalenti (stesso end-point), evitando di considerare un risultato positivo seguito da uno negativo come complessivamente inconclusivo, in quanto nel secondo saggio possono non realizzarsi le condizioni metaboliche che permettono di evidenziare una intrinseca attività genotossica.

RISULTATI IN VITRO ED IN VIVO

Nella valutazione del potenziale genotossico di una sostanza maggiore rilevanza deve essere attribuita ad una evidenza di attività ottenuta in studi in vivo rispetto ad un risultato positivo in vitro. Teoricamente infatti fattori metabolici (quali la preferenziale detossificazione) e/o mancato assorbimento potrebbero impedire ad un mutageno in vitro di esercitare un'azione genotossica in vivo. Tuttavia, un risultato negativo in vivo costituisce una prova solo parziale di assenza di proprietà mutagene, soprattutto in presenza di risultati positivi in vitro. I tessuti accessibili all'analisi mutagenetica in vivo (midollo osseo, cellule germinali) sono infatti scarsamente accessibili e/o con limitate capacità metaboliche e quindi l'assenza di danni genetici rilevabili in essi non assicura la mancanza di effetti avversi su altri, più sensibili bersagli. A questo proposito viene attualmente raccomandato di effettuare gli studi in vivo su almeno due tessuti (p.es. midollo osseo ed epatociti), utilizzando eventualmente anche saggi aspecifici, come il rilevamento di addotti sul DNA, ove non siano stati sviluppati metodi genetici. Tra i mutageni in vivo, maggiore robustezza viene attribuita ad una risposta positiva rilevabile su un tessuto scarsamente accessibile come quello germinale. Le evidenze disponibili (su circa 40 sostanze per cui è stata dimostrata l'attività mutagena sulle cellule germinali dei roditori) indicano che se una sostanza è capace di esercitare un'azione mutagena sulla linea germinale, essa è invariabilmente attiva anche a livello somatico, mentre solo una minoranza di queste ultime risulta attiva a livello germinale. Come conseguenza si ritiene lecito assumere che una sostanza che risulti inattiva in saggi in vivo a livello somatico (p.es. sul midollo osseo)

rappresenti un rischio di danni ereditari trascurabile. Altresì maggiore rilevanza deve essere attribuita a risultati positivi ottenuti in condizioni sperimentali non esasperate (come dosaggio o tossicità), soprattutto nei saggi in vitro in cui possono originarsi artefatti dovuti ad effetti aspecifici (p.es. alterazioni della osmolalità del mezzo colturale).

FALSI POSITIVI

L'analisi dei dati NCI/NTP dimostra inequivocabilmente che non tutti i mutageni in vitro sono cancerogeni (per quanto nella quota di "falsi" positivi osservata siano certamente inclusi dei deboli cancerogeni non individuati negli esperimenti a lungo termine). La risposta mutagena in vitro va quindi considerata un utile campanello d'allarme che necessita comunque di una conferma. Tenendo presente che i fattori che impediscono ad un mutageno in vitro di esercitare un'azione cancerogena nel mammifero (diverso metabolismo, caratteristiche farmacocinetiche, mancato assorbimento) sono gli stessi che ne sopprimono l'attività mutagena in vivo, si può concludere che la conferma dell'attività mutagena in vivo aumenta in modo decisivo la probabilità che essa sia cancerogena. In termini pratici, ciò porta a considerare le sostanze mutagene in vivo come potenziali cancerogeni genotossici.

FALSI NEGATIVI

La sperimentazione tossicologica condotta negli ultimi anni ha dimostrato in modo altrettanto inequivocabile l'esistenza di agenti cancerogeni privi di attuali o potenziali centri elettrofilici ed inattivi negli STT. Tali agenti (definiti talvolta cancerogeni epigenetici o non genotossici) potrebbero esercitare la loro azione cancerogena agendo negli stadi successivi del processo neoplastico, modificando l'omeostasi nei tessuti bersaglio ed aumentando la possibilità di sviluppo di eventuali cellule "iniziate" al processo neoplastico da agenti mutageni endogeni o ubiquitari. Il continuo tentativo peraltro fallito di ottenere una risposta mutagena anche da questi cancerogeni non genotossici è stato il motivo principale del proliferare di STT negli anni passati. Attualmente, riconosciuta la possibilità per alcune sostanze di esercitare un'azione cancerogena con un meccanismo non genetico, appare vano continuare il tentativo di evocare da essi una risposta mutagena allargando oltre misura le batterie di STT con una inaccettabile perdita di specificità (proporzione di mutageni cancerogeni). Si suppone invece che questi cancerogeni non genotossici potrebbero essere eventualmente individuati da STT capaci di individuare modifiche nei meccanismi di controllo cellulari. Sebbene lo sviluppo di tali metodiche sia ritenuto un obiettivo prioritario, esso appare tuttavia subordinato all'acquisizione di una migliore comprensione dei meccanismi di cancerogenesi. Attualmente la definizione delle proprietà mutagene dei cancerogeni viene talvolta considerata importante per la estrapolazione degli effetti alle basse dosi, nell'ipotesi della esistenza di una dose soglia per l'attività dei cancerogeni non genotossici. Sebbene in alcuni casi plausibile, è importante però sottolineare che attualmente non esistono evidenze sperimentali che dimostrino l'esistenza di dosi soglia e che, sebbene di solito i cancerogeni non genotossici siano

attivi ad alte dosi, composti soggetti a bioaccumulo e/o resistenti alla biodegradazione possono essere attivi anche a dosi estremamente basse, come ben illustrato dalla 2,3,7,8-tetraclorobenzodiossina.

In conclusione, la definizione dell'attività mutagena costituisce una informazione di primaria importanza per la valutazione tossicologica delle sostanze chimiche, anche indipendentemente dalla predittività per gli effetti cancerogeni. Gli STT possono fornire anche un'utile stima del potenziale cancerogeno delle sostanze chimiche e continuano a mantenere un importante ruolo nella sperimentazione tossicologica.

BIBLIOGRAFIA

1. Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E., and Lee, F.D. (1973). Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 70, 2281-2285.
2. McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., and Ames, B.N. (1975). Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 5135-5139.
3. Hollstein, M., and McCann, J. (1979). Short-term tests for carcinogens and mutagens. *Mutation Research* 65, 133-226.
4. Zeiger, E. (1987) Carcinogenicity of mutagens: Predictive capability of the *Salmonella* mutagenesis assay for rodent carcinogenicity. *Cancer Research* 47, 1287-1298.
5. Tennant, R.W., Margolin, B.H., Shelby, M.D., Zeiger, E., Hanerman, J.K., Spalding, J., Caspary, W., Resnick, M., Stasiewicz, S., Anderson, B., and Minor, R. (1987). Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from *in vitro* genetic toxicity assays. *Science*, 236, 933-941.
6. ICPEMC Publication n.16, Testing for mutagens and carcinogens; the role of short-term genotoxicity assays. A Report prepared by the International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. (1988) *Mutation Research*, 205, 3-12.
7. Benigni, R., and Giuliani, A. (1985). Cluster analysis of short-term tests: a new methodological approach. *Mutation Research* 147, 139-151.