

METODI INNOVATIVI DI GENOTOSSICITÀ NEGLI ECOSISTEMI: UNA PANORAMICA

Renato Baudo

già Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pallanza (VB)

Introduzione

Gli studi sulle sostanze genotossiche, in particolare sui carcinogeni, risalgono a ben prima della scoperta del DNA. Infatti, una veloce ricerca su Wikipedia ricorda che già nel 1567 Paracelso sospettava che un allora ignoto agente, successivamente identificato con il radon, provocasse una malattia nei minatori. Successivamente, numerosi scienziati cercarono di identificare le cause di varie forme cancerose o, a partire dagli anni 20 del 1900, di indurre mutazioni utilizzando raggi X, raggi ultravioletti e agenti chimici.

Poi, nel 1953, James Watson e Francis Crick presentarono il modello a doppia elica del DNA, che rese plausibile interpretare le conseguenze di una esposizione ad agenti genotossici (fisici o chimici) come una alterazione del patrimonio genetico.

Ma la svolta si ottenne negli anni Settanta del secolo scorso, quando Bruce Ames mise a punto l'omonimo saggio per l'identificazione di mutageni. Una organizzazione in particolare, l'OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), si è da subito attivata per pubblicare linee guida (*Test Guidelines*) per il saggio di sostanze genotossiche, ben 19 a partire dagli anni Ottanta, di seguito elencate:

- 471 *Bacterial Reverse Mutation Test* (1983)
- 473 *In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test* (1997)
- 474 *Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test* (1997)
- 475 *Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test* (1997)
- 476 *In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test* (1997)
- 477 *Genetic Toxicology: SLRL Test in Drosophila melanogaster* (1984)
- 478 *Genetic Toxicology: Rodent Dominant Lethal Test* (1984)
- 479 *Genetic Toxicology: In vitro Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells* (1986)
- 480 *Genetic Toxicology: Saccharomyces cerevisiae, Gene Mutation Assay* (1986)
- 481 *Genetic Toxicology: Saccharomyces cerevisiae, Mitotic Recombination Assay* (1986)
- 482 *Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells in vitro* (1986)
- 483 *Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test* (1997)
- 484 *Genetic Toxicology: Mouse Spot Test* (1986)
- 485 *Genetic Toxicology: Mouse Heritable Translocation Assay* (1986)
- 486 *Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver in vivo* (1997)
- 487 *In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test* (2010)
- 488 *Transgenic rodent somatic and germ cell gene mutation assays* (2011)
- 489 *In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay* (2016)
- 490 *In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene* (2016)

Con il passare del tempo, la maggior parte di queste linee guida è stata rivista e adeguata alle nuove esigenze di ricerca; 6 sono state però cancellate (*Test Guidelines* 477, 479, 480, 481, 482 e 484) e l'OECD stessa raccomanda che non vengano più utilizzate per nuove ricerche.

Ci sono state poi due aggiunte, per studi sulla carcinogenicità:
451 *Carcinogenicity Studies* (2009)
453 *Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies* (2009).

Saggi di genotossicità per la ricerca

In totale sono quindi disponibili 15 protocolli metodologici, che rispondono almeno parzialmente a diverse esigenze di ricerca: infatti, la *Test Guidelines* 471 prevede l'uso di batteri (*S. typhimurium*, *Escherichia coli*), mentre le altre impiegano linee cellulari di roditori (ratto, topo, criceto) e, in tre casi (*Test Guidelines* 473, 476 e 486) ammettono anche l'uso di linee cellulari umane.

Complessivamente, queste Linee Guida offrono quella flessibilità dei protocolli analitici richiesta dalle ricerche scientifiche, essendo applicabili a matrici diverse, con differenti end point e modelli biologici. Ma, come giustamente puntualizzato dall'OECD, la scelta dell'uno o dell'altro metodo deve tener conto di alcuni vincoli:

- certi composti battericidi (es. antibiotici) possono interferire specificatamente con il sistema di replicazione cellulare dei mammiferi;
- certi composti carcinogeni per i mammiferi operano secondo meccanismi assenti nelle cellule batteriche;
- certe sostanze o i loro metaboliti non raggiungono il tessuto bersaglio;
- certe sostanze sono sesso-specifiche;
- i saggi *in vitro* solitamente richiedono un attivatore metabolico esogeno che può non interamente simulare le condizioni *in vivo*.

Se opportunamente applicati, i protocolli metodologici OECD consentono comunque di rispondere ad esempio ai requisiti del Regolamento (CE) 1907/2006 (noto come REACH: *Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals*), che prevede appunto l'uso di saggi specifici, quali la mutazione genica dei batteri *in vitro*, lo studio *in vitro* della mutagenicità su cellule di mammifero o *in vitro* del micronucleo, la mutazione genica *in vitro* su cellule di mammifero e perfino la proposta di sperimentazione per la genotossicità *in vivo* (se applicabile), per la valutazione delle proprietà genotossiche di composti chimici.

Saggi di tossicità nella routine

Il caso è però diverso se i saggi di genotossicità devono essere applicati, invece che a formulati di composizione nota, per controlli di routine su campioni ambientali che, solitamente, hanno una composizione ignota o solo parzialmente caratterizzata: per questo specifico scopo, i protocolli metodologici devono preferibilmente essere semplici, rapidi, economici ma, soprattutto, standardizzati e riconosciuti come metodi ufficiali nazionali.

Per quanto riguarda i protocolli standardizzati è quindi scontato guardare innanzi tutto a quelli pubblicati dalla ISO (*International Organization for Standardization*) che, a differenza delle Linee Guida OECD – le quali, generalmente, ammettono una certa flessibilità nelle condizioni operative - fissano precise regole di esecuzione dei saggi, in modo tale da garantire che laboratori diversi, applicando lo stesso protocollo ad un medesimo campione, ottengano risultati del tutto comparabili.

A partire dal 2000, la ISO ha pubblicato 9 diversi standard dedicati ai saggi di genotossicità:

- ISO 11350:2012. *Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test). Confirmed in 2017.*
- ISO 13829:2000. *Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test. Confirmed in 2016.*
- ISO 21427-1:2006. *Water quality – Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei – Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae. Confirmed in 2015.*
- ISO 21427-2:2006. *Water quality – Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei – Part 2: Mixed population method using the cell line V79. Confirmed in 2015.*
- ISO 16240:2005. *Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome test (Ames test). Confirmed in 2014.*
- ISO 10993-3:2014. *Biological evaluation of medical devices – Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity.*
- ISO/TR 10993-33:2015. *Biological evaluation of medical devices – Part 33: Guidance on tests to evaluate genotoxicity – Supplement to ISO 10993-3.*
- ISO 29200:2013. *Soil quality – Assessment of genotoxic effects on higher plants – Vicia faba micronucleus test.*

Purtroppo, solo due standard sono stati riconosciuti come metodi ufficiali CEN (vincolanti per i Paesi dell'Unione Europea) e quindi automaticamente adottati in Italia come metodi ufficiali UNI:

- UNI EN ISO 21427-2:2009. *Qualità dell'acqua - Valutazione della genotossicità per mezzo della misurazione dell'induzione di micronuclei - Parte 2: Metodo a popolazione mista che utilizza la linea delle cellule V79.*
- UNI EN ISO 10993-3:2015. *Valutazione biologica dei dispositivi medici - Parte 3: Prove di genotossicità, carcinogenicità e tossicità sulla riproduzione.*

A questi si può aggiungere lo standard ISO 29200:2013, che ha trovato una controparte nella linea guida dell'Istituto Superiore di Sanità (Rapporti ISTISAN 13/27) (Gustavino *et al.*, 2013).

Il *Technical Report* 10993-33 evidentemente esula dal contesto qui considerato, quindi complessivamente, si può contare su due soli metodi standardizzati e ufficiali che, fortunatamente, utilizzano linee cellulari vegetali (Rapporti ISTISAN 13/27), oltre che animali (UNI EN ISO 21427-2:2009).

Tuttavia, considerando che saggi di genotossicità sono richiesti od auspicabili nel controllo di routine sia in campo ambientale (acqua, aria, suolo, rifiuti, ecc.) che a salvaguardia della salute (medicina del lavoro, alimenti, farmaci, cosmetici, ecc.), è auspicabile un ampliamento degli strumenti attualmente disponibili.

Poiché i saggi di genotossicità e in particolare quelli in vivo, risultano ancora piuttosto complicati, richiedendo il mantenimento di colture cellulari e/o laboriose preparazioni dei materiali, attualmente vengono proposti anche particolari kit, che contengono tutto ciò che serve per effettuare i saggi (reagenti, colture e prodotti di consumo), pronti all'uso anche per laboratori non specialistici. Questi kit sono stati scelti in diversi studi ad esempio in studi di genotossicità di acque superficiali (Zani *et al.*, 2005), sedimenti fluviali (Šestinová *et al.*, 2017), acque reflue (Kocak, 2015; Eck-Varanka *et al.*, 2016; Jabbour *et al.*, 2016; Vijay *et al.*, 2017), della frazione PM10 del particolato atmosferico (Piekarska *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2019) e degli eluati da

discariche di materiali plastici (Alabi *et al.*, 2019); sono stati selezionati anche per verificare la genotossicità di acque potabili conservate in bottiglie in PET Ubomba-Jaswa *et al.*, 2010 e la mutagenicità di un immunomodulatore antivirale (Tobólska *et al.*, 2018) e di nuovi candidati dolcificanti (Rega *et al.*, 2017).

Esistono, infine, kit che si basano su ceppi batterici ingegnerizzati per esprimere enzimi umani, con lo scopo di “mimare” ciò che avverrebbe all’interno dell’organismo umano (Honda *et al.*, 2016).

Conclusioni

Questa veloce panoramica evidenzia chiaramente che lo sviluppo di protocolli metodologici per i saggi di genotossicità procede a due velocità: per le diverse esigenze di ricerca, in tutto il mondo, Italia compresa, numerosissimi laboratori continuano a sviluppare nuovi metodi ad un ritmo accelerato, a mano a mano che si prospettano nuovi problemi e, soprattutto, vengono formulati nuovi xenobiotici potenzialmente genotossici.

Purtroppo, non si può dire altrettanto per i saggi che potrebbero e dovrebbero trovare concreta applicazione nei laboratori chiamati ad utilizzare nella routine i saggi di genotossicità, perché molto meno risorse vengono investite nei processi di ottimizzazione e standardizzazione dei rispettivi protocolli metodologici.

Per questo, è necessario che le organizzazioni competenti, ovvero l’Istituto Superiore di Sanità (ISS) e l’Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) in collaborazione con Università e laboratori pubblici e privati, organizzino gli indispensabili interconfronti richiesti per una standardizzazione dei metodi, a sua volta premessa irrinunciabile perché tali metodi trovino un riconoscimento ufficiale e possano essere proposti per l’inclusione dei saggi di genotossicità nella normativa vigente.

Bibliografia

- Alabi OA, Sorungbe AA, Adeoluwa YM. *In vitro* mutagenicity and genotoxicity of raw and simulated leachates from plastic waste dumpsite. *Toxicol Mech Methods* 2019;29(6):403-10.
- Eck-Varanka B, Kováts N, Paulovits G, *et al.* Assessment of municipal wastewater genotoxicity using the Ames fluctuation test, the SOS Chromotest and the mussel micronucleus test: a comparison. *IJEE* 2016;3(1):135-8.
- Gustavino B, Caciolli S, Mancini L. *Linea guida del test dei micronuclei in Vicia faba per la valutazione di effetti mutageni in acque dolci e sedimenti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/27).
- Honda H, Minegawa K, Fujita Y, *et al.* Modified Ames test using a strain expressing human sulfotransferase 1C2 to assess the mutagenicity of methyleugenol. *Genes Environ* 2016;38(1).
- Jabbour J-F, Farah J, Abdel-Massih RM. Hospital wastewater genotoxicity: A comparison study between an urban and rural university hospital with and without metabolic activation. *J Environ Eng Ecol Sci* 2016;5(2):1-6.
- Kocak E. Investigation of potential genotoxic activity using the SOS Chromotest for real paracetamol wastewater and the wastewater treated by the Fenton process. *J Environ Health Sci Eng* 2015;13:66.
- Piekarska K, Zaciera M, Czarny A, Zaczyńska E. Application of short-term tests in assessment of atmospheric air pollution. *Environ Prot Eng* 2011;37(2):85-98.

- Rega MF, Siciliano A, Gesuele R, Lofrano G, Carpentieri A, Picone D, Guida M. Ecotoxicological survey of MNEI and Y65R-MNEI proteins as new potential high-intensity sweeteners. *Environmental Science and Pollution Research* 2017;24(10):9734-40.
- Romano S, Perrone MR, Becagli S, Pietrogrande MC, Russo M, Caricato R, Lionetto MG. Ecotoxicity, genotoxicity, and oxidative potential tests of atmospheric PM10 particles. *Atmospheric Environment* 2019;221:1-11.
- Šestinová O, Findoráková L, Hančulák J, Špaldon T. Investigation of genotoxicity in river sediments. *Nova Biotechnol Chim.* 2017;16(2):86-91.
- Tobólska S, Terpilowska S, Jaroszewski J, Siwicki AK. Genotoxicity and Mutagenicity of Inosine Pranobex. *J Vet Res* 2018;62(2):207-13.
- Ubomba-Jaswa E, Fernández-Ibáñez P, McGuigan KG. A Preliminary Ames fluctuation assay assessment of the genotoxicity of drinking water that has been solar disinfected in Polyethylene Terephthalate (PET) Bottles. *J Water Health* 2010;8(4):712-9.
- Vijay U, Gupta S, Mathur P, Bhatnagar P. Evaluating genotoxicity of treated wastewater from health centers with special reference to their mutagenicity. *EC Microbiology* 2017;12(2):83-96.
- Zani C, Feretti D, Buschini A, Poli P, Rossi C, Guzzella L, Di Caterino F, Monarca S. Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2005;587(1-2):26-37.