

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN ONCOLOGIA E
PATOLOGIA SPERIMENTALE
PROGETTO N.1 ONCOLOGIA
XXI CICLO

Settore scientifico disciplinare di afferenza:
MED/04

ANALISI DEL PROFILO TOSSICOLOGICO E
CANCEROGENO DI CONTAMINANTI AMBIENTALI E
IDENTIFICAZIONE DEI RISCHI PER LA SALUTE
UMANA CORRELATI ALL'ESPOSIZIONE

Tesi di dottorato di ricerca presentata da:
Dott.ssa Francesca Rotondo

Coordinatore Dottorato:
Chiar.mo Prof.Sandro Grilli

Relatore:
Chiar.mo Prof.Sandro Grilli

Esame finale anno 2008

Indice

Introduzione	pag. 5
I Policlorodifenili	pag. 13
Approccio metodologico	pag. 45
Materiali e metodi	pag. 55
Risultati	pag. 83
Discussione	pag. 119
Bibliografia	pag. 135

Introduzione

La valutazione approfondita dei rischi per l'uomo correlati all'esposizione a contaminanti ambientali, sostanze chimiche o farmaci è di prioritaria importanza nell'ambito della salvaguardia della salute umana e della tutela dell'ambiente.

Tali sostanze, infatti, possono essere responsabili di un aumento del rischio cancerogeno.

Quando si fa riferimento alle contaminazioni ambientali, si deve tener presente che si tratta di miscele eterogenee di molecole, che necessitano, per un'analisi accurata del rischio, di una grande quantità di test per la valutazione sia del potenziale cancerogeno che del profilo tossicologico.

L'identificazione del rischio riguardante il potenziale tossicologico di una data sostanza prevede la valutazione di diversi aspetti: da una parte lo studio di proprietà tossicodinamiche e tossicocinetiche, sia qualitative che quantitative, legate all'assorbimento, al potenziale di bioaccumulo, alla distribuzione nei tessuti dell'organismo, al metabolismo ed ai fattori legati all'eliminazione attraverso gli escreti, dall'altra una valutazione tossicologica "in senso lato" che possa fornire i parametri per una stima del rischio da esposizione a una data miscela in una matrice in modo tale da fornire relazioni dose-risposta.

A tale riguardo è importante tener presente che il rilascio nell'ambiente di miscele complesse, ad esempio, innesca una serie di eventi che alterano sia in maniera qualitativa che quantitativa i rapporti preesistenti tra le singole componenti chimiche. Tali

alterazioni sono tanto più sostanziali quanto maggiore è il periodo di permanenza nell'ambiente. Lo stesso discorso si potrebbe fare nella somministrazione di un farmaco o di un cocktail di farmaci, i cui possibili effetti sono dipendenti dall'interazione delle singole componenti tra di loro e in rapporto all'organismo che li riceve.

Per questo motivo l'esposizione a miscele complesse determina una serie di effetti, non sempre prevedibili, dipendenti dai meccanismi d'azione delle singole molecole e dai possibili effetti sinergici, additivi o antagonisti tra le molecole stesse o con l'organismo ospite.

Se, ad esempio, si considera un campione prelevato dall'ambiente, questo è un prodotto finale che dipende dall'abilità delle diverse frazioni di una miscela a ripartirsi nelle differenti matrici ambientali (aria, acqua, sedimento, terreno), dai processi di biodegradazione operati da microrganismi, dai meccanismi di bioaccumulo in altri esseri viventi, vegetali e animali, il cui metabolismo produrrà residui considerevolmente differenti dai composti originali.

Nell'ambito dell'analisi del rischio associata a contaminazioni ambientali, la caratterizzazione tossicologica dovrebbe disporre di strumenti veloci, predittivi e a costo contenuto. I test a lungo termine su animali, tradizionalmente punto di sicuro riferimento per la categorizzazione dei cancerogeni, in assenza di dati epidemiologici o a rafforzamento di questi, hanno dimostrato limiti tali da indurre più di una incertezza nella trasferibilità alla specie umana.

Molti dei dati disponibili sono stati ottenuti in ceppi di ratti o topi particolarmente suscettibili all'induzione del tumore. Il diverso metabolismo murino e le differenze di metabolismo persino tra le due specie di elezione, ratto e topo, sono tali da rendere difficoltosa l'interpretazione del rischio per l'uomo. Le vie di somministrazione del cancerogeno spesso non riflettono le reali vie di esposizione umana: una somministrazione forzata per gavaggio non avrà mai un riscontro nell'uomo. Le dosi sperimentali sono sempre molto più elevate dei livelli di esposizione umana e ciò costituisce un problema soprattutto riguardo a quelle sostanze non genotossiche per le quali è possibile ricavare una dose-soglia. I costi della sperimentazione animale, le procedure e la logistica richieste dalle norme GLP (*Good Laboratory Practice*) rendono tale approccio di studio appannaggio di pochi, selezionati centri. I tempi di sperimentazione sono improponibili in caso di situazioni di emergenza, in cui è necessario intervenire con rapidità per contenere non solo i reali rischi da esposizione, ma anche la preoccupazione derivante da cattiva informazione o dalla mancanza di elementi atti ad una valutazione equilibrata.

La necessità di sviluppare test tossicologici e di cancerogenesi in vitro sorge, quindi, dall'esigenza di ridurre l'uso di animali da laboratorio e contemporaneamente standardizzare sistemi rapidi e a basso costo caratterizzati da rilevanza, validità e riproducibilità.

Nelle linee guida proposte dall'EPA (*Environmental Protection Agency*, 1996) si dà importanza ad una valutazione del rischio basata su una serie di dati, non necessariamente ottenuti in modelli animali, che possano concorrere all'ottenimento di una informazione univoca sul tipo ed estensione del danno indotto dalla sostanza in esame utilizzando test che siano in grado di mettere in luce relazioni dose-risposta e i possibili meccanismi d'azione del composto o miscela oggetto dello studio.

Tenendo conto delle difficoltà sia di tipo economico che pratico riscontrate nei test *in vivo* la comunità scientifica si è aperta alla possibilità di approcciare lo studio delle molecole di interesse attraverso l'uso di test *in vitro*, più rapidi e meno costosi. La normativa europea REACH (*Registration Evaluation and Authorization of CHemicals*, <http://eur-lex.europa.eu>) invitando a limitare gli studi nell'animale, ha fornito ulteriore impulso all'uso e alla messa a punto di metodi *in vitro* per lo screening di tossicità e di cancerogenesi.

Nei modelli cellulari *in vitro* è possibile, infatti, verificare un pannello di marcatori biomolecolari corrispondenti a *end-point* rilevati *in vivo* nell'animale e nell'uomo. Questo tipo di approccio può costituire uno strumento di estrema utilità per la ricerca sul cancro. Questi sistemi, oltre a riflettere la sequenza di eventi genetici distintivi del tipo di neoplasia in esame, hanno il vantaggio di consentire una ampia riproducibilità dei risultati. Un buon modello *in vitro*, infatti, permette di approfondire i

meccanismi molecolari di trasformazione neoplastica, fornendo informazioni utili da trasferire nella pratica clinica. In questo modo è possibile individuare il profilo di attività di composti biologicamente attivi o di associazioni di molecole evidenziando anche eventuali fenomeni di cooperazione o antagonismo.

Tenendo presente che nella sperimentazione *in vitro* c'è un'inevitabile semplificazione della rete dei rapporti d'organo, si può affermare che le cellule in coltura riproducono le differenze di attività di geni e proteine osservate tra cellule cancerose e normali. Questo tipo di riflessione ha permesso la progettazione di saggi *in vitro* sempre più fini e l'individuazione di *end-point* biochimici, morfologici, genetici correlati al processo di cancerogenesi ed alla sua inibizione.

In ogni caso anche se la sequenza degli eventi osservati *in vitro* può non essere la stessa che si verifica nello sviluppo della neoplasia *in vivo*, l'uso di modelli di colture cellulari può contribuire alla spiegazione delle alterazioni a livello molecolare responsabili del processo tumorale.

Obiettivo del presente studio è indagare il rischio rappresentato da sostanze ad attività interferente endocrina mediante *end-points* *in vitro* idonei a tracciarne il profilo tossicologico e a caratterizzare i possibili danni a lungo termine in termini di cancerogenesi, contribuendo nel contempo ad una miglior comprensione scientifica degli effetti dovuti all'esposizione a tali molecole e ad una più oculata valutazione e gestione del rischio ad esse legato. Lo studio si è concentrato sull'analisi della attività di

composti singoli, loro associazioni o miscele commerciali da utilizzarsi come standard di riferimento, per poi procedere all'analisi di miscele complesse di origine ambientale.

I Policlorodifenili

Storia dei PCB

I PCB, scoperti negli Stati Uniti verso la fine degli anni venti dall'industria agro-chimica Monsanto, vennero brevettati e subito prodotti su larga scala, raggiungendo un grande interesse commerciale verso l'inizio degli anni cinquanta. Il brevetto venne concesso ad un'azienda per ognuno dei principali paesi industrializzati (Giappone, Germania, Inghilterra, Francia, Italia e Spagna). In Italia iniziò a produrli, dal 1938, la Caffaro di Brescia, un'industria chimica produttrice di soda caustica, composti organici, cloro e suoi derivati sorta nel 1906 (Ruzzenenti 2001).

I Policlorodifenili (PCB) sono prodotti dalla clorazione diretta del difenile. Con temperature superiori ai 750°C il benzene in presenza di piombo come catalizzatore reagisce formando difenili. Questo per reazione con cloro gassoso e in presenza di FeCl_3 come catalizzatore dà origine a cloroderivati per sostituzione degli atomi di H. Quanto maggiore è la quantità di Cl_2 , tanto più lunga sarà la durata della reazione e tanto maggiore il grado di clorurazione con formazione dei PCB (www.csgi.unifi.it).

I PCB costituiscono delle miscele tecniche estremamente duttili, caratterizzate da un'elevata stabilità chimica, dalla non infiammabilità e da un'elevata costante dielettrica; tali proprietà ne hanno determinato il largo uso in una serie di applicazioni industriali e commerciali, come elencato in tabella 1.

USO DEI PCB
Fluidi dielettrici per condensatori e trasformatori
Fluidi per scambio termico
Fluidi per circuiti idraulici
Lubrificanti e oli da taglio
Additivi in vernici
Pesticidi
Circuiti stampanti
Adesivi
Sigillanti
Ritardanti di fiamma
Isolanti
Fissanti per microscopia

Tab. 1 Possibili utilizzi dei PCB

La notevole inerzia verso altri composti e l'elevata resistenza al calore sono state sfruttate in diverse applicazioni industriali, classificate in tre categorie (Pavan et al. 2003):

- sistemi chiusi controllabili, in cui i PCB sono impiegati come fluidi dielettrici in accumulatori e trasformatori (77% dell'utilizzo) con scarse perdite nell'ambiente
- sistemi chiusi non controllabili, in cui i PCB sono stati usati come fluidi in sistemi idraulici e radiatori con perdite frequenti nell'ambiente

- usi dissipativi, in cui i PCB sono stati utilizzati come: lubrificanti ed oli da taglio industriali, additivi di pesticidi, carta copiatrice, adesivi, composti plastici e vernici.

Tutti questi usi permettono il diretto contatto di PCB con l'ambiente.

A partire dal loro primo utilizzo, si stima che la produzione mondiale sia stata di 1.5 milioni di tonnellate. Solo negli Stati Uniti ne sono state prodotte 670.000 tonnellate e quantità analoghe si possono stimare per l'Europa, se si tiene conto che la Caffaro da sola ne ha messe in commercio 150.000 tonnellate.

I PCB sono caratterizzati dal fatto di essere estremamente resistenti alla biodegradazione e di avere la capacità di essere assorbiti dagli organismi e di accumularsi nel pannicolo adiposo dell'uomo e degli animali.

La maggior fonte di contaminazione umana è l'assunzione attraverso gli alimenti, anche se, in alcuni casi, non sono da sottovalutare l'inalazione e l'esposizione cutanea. La cronaca ha riportato episodi acuti di inquinamento da PCB, il più clamoroso quello dei polli ai PCB e alla diossina in Belgio nel 1998: qui, nella produzione dei mangimi, vennero erroneamente scambiati oli idraulici destinati allo smaltimento, per oli vegetali esausti da friggitoria (van Larebeke et al. 2001).

Nel 1971 in North Carolina, una partita di farina di pesce per l'alimentazione dei polli fu contaminata da

PCB, presenti in un'apparecchiatura difettosa come fluido scambiatore di calore (www.ambientebrescia.it).

La pericolosità di questi composti è stata sottovalutata per molti anni e per questo motivo il loro uso si è diffuso in maniera incontrollata.

I primi paesi a terminare la produzione furono il Giappone nel 1972, gli Stati Uniti nel 1977, la Germania nel 1983 l'Italia nel 1984 (Fieldler 2001).

Nel 1972 è stato vietato l'impiego di PCB in sistemi aperti, ossia vernici, masse di sigillatura, stoffe e carta. Nel 1996 (Direttiva 96/59/CE) è entrato in vigore il divieto generale di impiego dei PCB.

Attualmente l'ulteriore immissione di queste sostanze nei comparti ambientali è in gran parte determinata da scorrette pratiche di smaltimento o dalla fuoriuscita da apparecchiature elettriche e da impianti idraulici ancora in uso. Anche i possibili incendi in zone inquinate, l'incenerimento di rifiuti, gli scarichi illeciti e le discariche sono possibili fonti di inquinamento, senza tralasciare la possibilità che ci sia migrazione di particelle e emissione nell'atmosfera a seguito di evaporazione e la presenza di riserve di PCB nei sedimenti marini e fluviali e nei fanghi di dragaggio dei porti.

Altre sorgenti di contaminazione sono imputate alle vernici di ponti (rivestimenti di protezione contro la corrosione), ai condensatori (si stima infatti che siano presenti sul territorio nazionale oltre 30.000 trasformatori elettrici con concentrazioni di PCB estremamente elevate, mentre è presunta l'esistenza di circa 45.000 condensatori contaminati di massa

superiore a 1 Kg) (www.regione.emilia-romagna.it) e alle masse di sigillatura dei giunti delle grandi edificazioni di calcestruzzo di vecchia data (Ruzzenenti 2001).

Un quadro generale della situazione italiana in rapporto al numero di apparecchi presenti nel territorio che ancora contengono PCB è rappresentato in tabella 2.

REGIONE	N° apparecchi	N° apparecchi con concentrazione superiore a 500 mg/kg	N° apparecchi con concentrazione compresa tra 50 e 500 mg/kg	Quantità totale di PCB per apparecchi con concentrazione superiore a 500 mg/kg kg
Abruzzo	1.010	39	971	9.719,00
Basilicata	536	17	504	6.824,00
Calabria	1.444	60	1384	49.199,00
Campania	1.886	158	1728	94.586,00
Emilia Romagna	5.513	1.186	4.327	168.773,53
Friuli Venezia Giulia	1.115	182	933	123.200,00
Lazio	2.589	440	2.149	282.070,00
Liguria	3.495	1.074	2.421	283.117,85
Lombardia	5.202	2.246	2.956	997.434,00
Marche	1.638	66	1.454	28.153,00
Molise	872	472	400	4.552,31
Piemonte	6.234	1.598	4.636	357.391,00
Puglia	815	213	602	486.626,00
Sardegna	1.778	260	1.207	163.596,00
Sicilia	4.290	452	3.838	472.796,95
Toscana	4.604	676	3.928	488.295,80
Trento	257	51	206	4.652,00
Bolzano	160	5	155	1.009,00
Umbria	1.214	142	1.072	159.592,00
Valle D' Aosta	nd	nd	nd	nd
Veneto	3.035	388	2.165	189.652,00
TOTALE	47.687	9.725	37.036	4.371.239,44

Tab. 2 Numero di apparecchi contenenti PCB suddivisi nelle due tipologie differenziate per concentrazione: superiore a 0.05% (500 mg/kg) o compresa nell'intervallo 0.005% e 0.05% (50 mg/kg e 500 mg/kg) (GAZZETTA UFFICIALE n. 130 7-06-2007).

Considerando che queste sono attualmente le fonti di inquinamento presenti, non bisogna dimenticare che in alcuni paesi in via di sviluppo l'uso di queste miscele è ancora legale.

Si può quindi affermare che i PCB circolano nell'ambiente a livello globale.

La loro persistenza nell'ambiente varia in rapporto alle caratteristiche chimiche e fisiche del singolo congenere; all'interno dell'intera classe di PCB ci sono molecole con tempi di degradazione estremamente differenti, ad esempio possono variare dai 3 agli oltre 27 anni. Alcuni sono molto stabili in presenza di acidi e basi forti, per cui non degradano per idrolisi e la stessa degradazione ossidativa richiede comunque molta energia. Possono essere distrutti nei processi di incenerimento o degradati lentamente da alcuni microrganismi ed anche in questo caso il tempo di tale processo dipende dal grado di clorazione e dalla posizione degli atomi di cloro. La mineralizzazione è un altro possibile meccanismo, tuttavia avviene solo con forti radiazioni UV. Naturalmente questo tipo di situazione complica ulteriormente i processi di smaltimento.

In virtù della diminuzione della concentrazione ambientale, il carico negli ultimi 15 anni si è drasticamente ridotto. Affinché questa tendenza persista, occorre smaltire le potenziali fonti residue di contaminazione, applicando determinate procedure e attenzioni (Ufficio Federale Sanità Pubblica, 2002).

Caratteristiche chimiche dei PCB e nomenclatura

La formula chimica generica è $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ con n che varia da 1 a 10, la struttura di base è rappresentata in fig. 1.

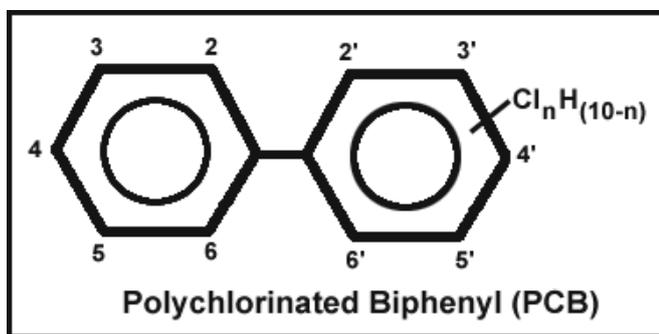


Fig. 1

Generalmente con il termine PCB si intende una miscela di più congeneri, dai monoclorodifenili ai decaclorodifenili, raggruppati secondo il loro grado di clorazione in 10 classi di omologhi. All'interno di ciascuna classe gli isomeri differiscono tra loro esclusivamente per la posizione assunta dagli atomi di cloro (es. 2 dei 12 triclorodifenili sono gli isomeri 2,3,4-Triclorodifenile e 3,3',5-Triclorodifenile) (Ruzzenenti 2001).

Molti autori utilizzano il termine PCB riferendosi alle miscele commerciali (es. Aroclors) piuttosto che all'intera classe componente. Tali miscele contengono percentuali diverse di cloro (es. 16%, 42%, 48%, 54%, 60%) ed impurità di sostanze tossiche tra le quali

Dibenzofurano policlorinato (PCDF) e Naftalene clorinato in concentrazione variabile (Pavan et al. 2003).

Le variazioni nel grado e nella posizione di clorurazione dell'anello portano alla formazione di 209 possibili congeneri; al fine di rendere più agevole l'identificazione di un singolo congenere dal punto di vista chimico, sono state proposte nel corso degli anni diverse classificazioni; attualmente la più utilizzata (dai ricercatori) è quella di Ballschmiter e Zell (1980) che assegna un numero progressivo da 1 a 209 ai singoli congeneri a seconda del minor o maggior grado di clorazione (tabella 3) (Pavan et al. 2003).

In tabella 4 sono elencati alcuni degli Aroclors commerciali e la loro composizione.

No.	Struttura	No.	Struttura	No.	Struttura	No.	Struttura
Monoclorobifenili		Tetraclorobifenili		Pentaclorobifenili		Esaclorobifenili	
1	2	52	2,2',5,5'	107	2,3,3',4',5	161	2,3,3',4,5',6
2	3	53	2,2',5,6'	108	2,3,3',4,5'	162	2,3,3',4',5,5'
3	4	54	2,2',6,6'	109	2,3,3',4,6	163	2,3,3',4',5,6
		55	2,3,3',4	110	2,3,3',4',6	164	2,3,3',4',5',6
Diclorobifenili		56	2,3,3',4'	111	2,3,3',5,5'	165	2,3,3',5,5',6
4	2,2'	57	2,3,3',5	112	2,3,3',5,6	166	2,3,4,4',5,6
5	2,3	58	2,3,3',5'	113	2,3,3',5',6	167	2,3',4,4',5,5'
6	2,3'	59	2,3,3',6	114	2,3,4,4',5	168	2,3',4,4',5',6
7	2,4	60	2,3,4,4'	115	2,3,4,4',6	169	3,3',4,4',5,5'
8	2,4'	61	2,3,4,5	116	2,3,4,5,6		
9	2,5	62	2,3,4,6	117	2,3,4',5,6	Eptaclorobifenili	
10	2,6	63	2,3,4',5	118	2,3',4,4',5	170	2,2',3,3',4,4',5
11	3,3'	64	2,3,4',6	119	2,3,4,4',6	171	2,2',3,3',4,4',6
12	3,4	65	2,3,5,6	120	2,3',4,5,5'	172	2,2',3,3',4,5,5'
13	3,4'	66	2,3',4,4'	121	2,3',4,5',6	173	2,2',3,3',4,5,6
14	3,5	67	2,3',4,5	122	2',3,3',4,5	174	2,2',3,3',4,5,6'
15	4,4'	68	2,3',4,5'	123	2',3,4,4',5	175	2,2',3,3',4,5',6
		69	2,3',4,6	124	2',3,4,5,5'	176	2,2',3,3',4,6,6'
Triclorobifenili		70	2,3',4',5	125	2',3,4,5,6'	177	2,2',3,3',4',5,6
16	2,2',3	71	2,3,4',6	126	3,3',4,4',5	178	2,2',3,3',5,5',6
17	2,2',4	72	2,3',5,5'	127	3,3',4,5,5'	179	2,2',3,3',5,6,6'
18	2,2',5	73	2,3',5',6			180	2,2',3,4,4',5,5'
19	2,2',6	74	2,4,4',5	Esaclorobifenili		181	2,2',3,4,4',5,6
20	2,3,3'	75	2,4,4',6	128	2,2',3,3',4,4'	182	2,2',3,4,4',5,6'
21	2,3,4	76	2',3,4,5	129	2,2',3,3',4,5	183	2,2',3,4,4',5',6
22	2,3,4'	77	3,3',4,4'	130	2,2',3,3',4,5'	184	2,2',3,4,4',6,6'
23	2,3,5	78	3,3',4,5	131	2,2',3,3',4,6	185	2,2',3,4,5,5',6
24	2,3,6	79	3,3',4,5'	132	2,2',3,3',4,6'	186	2,2',3,4,5,6,6'
25	2,3',4	80	3,3',5,5'	133	2,2',3,3',5,5'	187	2,2',3,4',5,5',6

26	2,3',5	81	3,4,4',5	134	2,2',3,3',5,6	188	2,2',3,4',5,6,6'
27	2,3',6			135	2,2',3,3',5,6'	189	2,3,3',4,4',5,5'
28	2,4,4'	Pentachlorobifenili		136	2,2',3,3',6,6'	190	2,3,3',4,4',5,6
29	2,4,5	82	2,2',3,3',4	137	2,2',3,4,4',5	191	2,3,3',4,4',5',6
30	2,4,6	83	2,2',3,3',5	138	2,2,3,4,4',5'	192	2,3,3',4,5,5',6
31	2,4',5	84	2,2',3,3',6	139	2,2',3,4,4',6	193	2,3,3',4',5,5',6
32	2,4',6	85	2,2',3,4,4'	140	2,2',3,4,4',6'		
33	2',3,4	86	2,2',3,4,5	141	2,2',3,4,5,5'	Octachlorobifenili	
34	2',3,5	87	2,2',3,4,5'	142	2,2',3,4,5,6	194	2,2',3,3',4,4',5,5'
35	3,3',4	88	2,2',3,4,6	143	2,2',3,4,5,6'	195	2,2',3,3',4,4',5,6
36	3,3',5	89	2,2',3,4,6'	144	2,2',3,4,5',6	196	2,2',3,3',4,4',5',6
37	3,4,4'	90	2,2',3,4',5	145	2,2',3,4,6,6'	197	2,2',3,3',4,4',6,6'
38	3,4,5	91	2,2',3,4',6	146	2,2',3,4',5,5'	198	2,2',3,3',4,5,5',6
39	3,4',5	92	2,2',3,5,5'	147	2,2',3,4',5,6	199	2,2,3,3',4',5,5',6
		93	2,2',3,5,6	148	2,2',3,4,5,6'	200	2,2',3,3',4,5,6,6'
		94	2,2',3,5,6'	149	2,2',3,4',5',6	201	2,2',3,3',4,5',6,6'
Tetrachlorobifenili							
40	2,2',3,3'	95	2,2',3,5',6	150	2,2',3,4',6,6'	202	2,2',3,3',5,5',6,6'
41	2,2',3,4	96	2,2',3,6,6'	151	2,2',3,5,5',6	203	2,2',3,4,4',5,5',6
42	2,2',3,4'	97	2,2',3',4,5	152	2,2',3,5,6,6	204	2,2',3,4,4',5,6,6'
43	2,2',3,5	98	2,2',3,4,6	153	2,2',4,4',5,5'	205	2,3,3',4,4',5,5',6'
44	2,2,3,5'	99	2,2',4,4',5	154	2,2',4,4,5,6'		
45	2,2',3,6	100	2,2',4,4',6	155	2,2',4,4',6,6'	Nonachlorobifenili	
46	2,2',3,6'	101	2,2',4,5,5'	156	2,3,3',4,4',5	206	2,2',3,3',4,4',5,5',6
47	2,2',4,4'	102	2,2',4,5,6'	157	2,3,3',4,4',5'	207	2,2',3,3',4,4',5,6,6'
48	2,2',4,5	103	2,2',4,5',6	158	2,3,3',4,4',6	208	2,2',3,3',4,5,5',6,6'
49	2,2',4,5'	104	2,2',4,6,6'	159	2,3,3',4,5,5'		
50	2,2',4,6	105	2,3,3',4,4'	160	2,3,4',4,5,6	Decachlorobifenili	
51	2,2',4,6'	106	2,3,3',4,5			209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6'

Tab. 3 Nomenclatura IUPAC di PCB-omologhi (Ballschmiter et al. 1980)

	Aroclor				
	1016	1242	1248	1254	1260
Mono-CBs	2	1	⌚	⌚	⌚
Di-CBs	19	13	1	⌚	⌚
Tri-CBs	57	45	21	1	⌚
Tetra-CBs	22	31	49	15	⌚
Penta-CBs	⌚	10	27	53	12
Esa-CBs	⌚	⌚	2	26	42
Epta-CBs	⌚	⌚	⌚	4	38
Octa-CBs	⌚	⌚	⌚	⌚	7
Nona-CBs	⌚	⌚	⌚	⌚	1
Deca-CBs	⌚	⌚	⌚	⌚	⌚

Tab. 4 Composizione di alcuni degli aroclors commerciali

Dal punto di vista chimico-fisico, i PCB sono caratterizzati da un'elevata stabilità dipendente anch'essa dal differente grado di clorazione.

In generale il punto di evaporazione e la lipofilia aumentano con il maggior grado di clorazione, la tensione di vapore e la solubilità nell'acqua invece diminuiscono.

Le caratteristiche chimico-fisiche più importanti dei PCB sono:

- stato liquido a temperatura ambiente

- densità: 1.1821566 kg/L
- bassa solubilità in acqua, alta solubilità in solventi organici
- alta temperatura di evaporazione: 170-380 °C
- non esplosivo
- bassa conduttività elettrica
- conducibilità termica molto alta
- stabilità elevata: alta resistenza alla degradazione termica e chimica (Fiedler 2001).

Tossicità dei PCB

In natura, la contaminazione da PCB non è omogenea, questo vuol dire che nei diversi comparti ambientali si distribuiscono miscele di PCB con percentuali diverse dei singoli congeneri.

La tossicità dei diversi PCB dipende dalla loro struttura e dal diverso grado di clorazione. I PCB meta e para-sostituiti sarebbero maggiormente attivi rispetto agli orto-sostituiti. La natura complessa delle miscele di PCB complica la valutazione del rischio sull'uomo. Ad esempio, congeneri che non hanno gruppi clorurati in posizione orto, o ne hanno uno solo, possono assumere una configurazione planare e per questo acquisire la capacità di legare l'*arylhydrocarbon receptor* (AhR). I PCB coplanari inducono una attivazione degli enzimi del *drug metabolism* simile a quella ottenuta dopo trattamento

con 3-metilcolantrene (3-MCA), mentre quelli che assumono una configurazione non planare determinano un pattern di espressione degli stessi enzimi analogo a quello ottenuto dopo trattamento con phenobarbital (Pérez-Reyes et al. 2001).

E' possibile fare una distinzione sulla base dell'attività tossicologica in

- PCB dioxin-like (DL-PCB)
- PCB non dioxin-like (NDL-PCB)

I DL-PCB sono 12 e per essere considerati tali devono rispettare una serie di caratteristiche strutturali; devono avere un solo atomo di cloro, o nessuno, in posizione orto, almeno un atomo di cloro in posizione para e due o più atomi di cloro in posizione meta; quando queste caratteristiche sono tutte presenti contemporaneamente si può parlare di PCB dioxin-like. Più in generale, si può dire che i DL-PCB hanno una struttura simile alla diossina (TCDD) e degli effetti tossici analoghi, un'elevata affinità di legame con il recettore arilico ed un'elevata persistenza nell'ambiente con conseguente accumulo nella catena alimentare (Knerr et al. 2006).

I NDL-PCB sono 197, essi rappresentano la porzione più consistente ed eterogenea, costituendo più del 90% dei congeneri trovati negli alimenti campione e nei tessuti umani (Knerr et al. 2006); su questa classe di congeneri non si hanno notizie altrettanto precise e non è ancora stata stabilita una valutazione scientifica del rischio.

Il meccanismo d'azione dei PCB coinvolge sicuramente l'AhR, inoltre, si riscontra un'attività anche a livello estrogenico e neurotossico non ancora completamente spiegata (www.atsdr.cdc.gov/toxprofile/tp17.pdf).

Sulla base di una possibile valutazione del rischio tossicologico i diversi congeneri possono essere classificati in gruppi funzionali:

- Gruppo I (estrogenici: 44, 49, 52, 101, 174, 177, 187, 201)
- Gruppo II (i DL-PCB, il PCB 126, i PCB anti-estrogenici, i PCB immunotossici e i PCB che inducono il sistema enzimatico del citocromo 1A, CYP1A)
- Gruppo III (i congeneri che inducono il CYP1A1 e il CYP2B, ovvero PCB 99, 153, 180, 183, 196, 203) (Wolff et al. 1995, Wolff et al. 1997).

Negli studi tossicologici vengono utilizzate, spesso, miscele tecniche che contengono sia NDL-PCB che DL-PCB; tali miscele, proprio per la varietà dei congeneri presenti, hanno determinato effetti diversi a livello di organi come tiroide, sistema immunitario, sullo sviluppo riproduttivo e neuronale; inoltre, di estremo interesse sono gli effetti a lungo termine che portano a alterazioni endocrine e processi di cancerogenesi (www.epa.gov 2005).

I PCB inducono alterazioni a livello neurologico sul feto ed anche sul neonato. Essendo lipofili, infatti,

si trasferiscono al latte materno e vengono assorbiti dal neonato portando a disturbi neurologici.

Esistono una grande quantità di studi che evidenziano i danni indotti dai PCB a livello endocrino con effetti sul livello degli ormoni tiroidei sia negli adulti che nei bambini. Tali danni sono in relazione al tempo di esposizione e all'età dell'organismo colpito.

L'azione dei PCB va a mimare quella degli ormoni endogeni agendo da interferenti endocrini. Negli ultimi anni è stata posta particolare attenzione alla capacità dei PCB di mimare o di antagonizzare l'azione degli estrogeni, ormoni che hanno un ruolo fondamentale sulla crescita, il differenziamento e la funzionalità di molti tessuti target, incluso il sistema riproduttivo maschile e femminile. Le alterazioni nel ciclo mestruale nelle donne e la riduzione della fertilità negli uomini sono effetti provati, insieme alle alterazioni delle ghiandole mammarie, dell'utero, delle ovaie, testicoli, epididimo e prostata (www.atsdr.cdc.gov/toxprofile/tp17.pdf).

A livello biologico gli effetti osservati a carico dei PCB sono, quindi, innumerevoli ed estremamente diversificati e la valutazione degli effetti sulla salute risulta complicata da svariati fattori ed in particolare dalla composizione specifica delle miscele. La tossicità delle miscele è attribuibile ai singoli congeneri che la compongono, alle loro interazioni e alle interazioni che essi hanno con le molecole con cui entrano in contatto.

L'effetto tossico dei PCB è stato osservato anche *in vitro*, ad esempio in colture di cellule neuronali di

ratto con una diminuzione della vitalità delle stesse causata dal danno neurotossico con conseguente apoptosi e necrosi (Sánchez-Alonso et al. 2004). Altri studi sono stati condotti sulla linea cellulare di ovario di *hamster* CHO-K1, dove il trattamento con alcune miscele di PCB ha determinato una riduzione del numero di cellule in coltura, una riduzione della quantità di proteine tissutali e una minore capacità da parte delle cellule di andare a formare delle colonie (Rogers et al. 1983).

Esistono studi a lungo termine effettuati sulle miscele commerciali di PCB, come ad esempio l'Aroclor 1260 (A1260), che è caratterizzato da elevata tossicità e capacità di indurre la comparsa di epatocarcinoma nei ratti in vivo (Norback et al. 1985). Inoltre sono stati condotti anche studi in parallelo su miscele differenti per ottenere una valutazione del rischio cancerogeno, come ad esempio l'A1260, l'A1254, l'A1242 e l'A1016 (Cogliano 1998). In particolare sull'A1254 sono stati condotti anche studi epidemiologici e studi sui ratti che hanno confermato la cancerogenicità di tale miscela (<http://www.inchem.org/documents/iarc/suppl7/polychlorinatedbiphenyls.html>).

Negli ultimi anni si sono moltiplicati gli studi di letteratura sui PCB singoli atti a valutare l'attività dei singoli congeneri e la loro effettiva pericolosità (Decastro et al. 2006, Knerr et al. 2006).

Studi specifici sono stati condotti nell'ambito del *National Toxicology Program* (NTP 2006) su alcuni congeneri di maggiore rilievo, il PCB 118, il PCB 126 e il PCB 153 e la combinazione tra il PCB 118 e il PCB

126. I risultati hanno portato ad accertare che l'esposizione ai PCB singoli o alla combinazione causa disfunzioni in diversi organi; il PCB 126 e la sua combinazione con il 118 inducono cancro al fegato, all'intestino e alla bocca, inoltre si è osservata ipertrofia e iperplasia di svariati organi (mucosa orale, intestino, timo, tiroide ecc.) (NTP 2006).

Oltre agli studi sugli animali, si sono effettuati studi di tipo epidemiologico su lavoratori esposti a PCB; da tali studi è emerso un aumento del rischio di cancro al fegato e di melanoma (www.epa.gov/osw/hazard/tsd/pcbs/pubs/effects.htm).

E' comunque difficile stabilire una relazione tra l'esposizione a tali miscele e i diversi effetti riscontrati, soprattutto in rapporto a congeneri labili, presenti inizialmente ma non rintracciabili in tempi successivi nei tessuti o nel sangue degli esposti; l'*outcome* clinico infatti risulta quindi difficilmente correlabile ai livelli di esposizione passati.

La valutazione degli studi di cancerogenesi, nei ratti, effettuata con miscele tecniche di PCB e il confronto con i dati ottenuti con la diossina (TCDD) indicano che le componenti diossino-simili nelle miscele di PCB sono probabilmente responsabili degli effetti cancerogeni delle miscele stesse (www.efsa.europa.eu); tuttavia studi successivi su congeneri singoli NDL-PCB ne hanno messo in evidenza il potenziale cancerogeno, in particolare l'attività nella fase di promozione tumorale (tabella 5).

Compound	Initiation regimen	Promotion regimen	Marker	Result	Reference
4,4'-Dichlorobiphenyl (PCB 15)	DEN for 12 days	0.2 or 0.4 nmol/kg/week PCB for 7 weeks	NR	-	Oesterle and Deml, 1983
4,4'-Dichlorobiphenyl (PCB 15)	Single dose of DEN	64 mg/kg of PCB once weekly for 7 weeks	ATP-	+/-	Deml et al., 1985
2,4,4'-Trichlorobiphenyl (PCB 28)	DEN for 10 days	50 or 150 μ mol/kg/week of PCB for 8 or 16 weeks	ATP- GSTP+	+/-	Kunz et al., 2006
2,2',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (PCB 47)	3 oral doses of 400 μ mol/kg PCBs weekly for 3 weeks	Resistant hepatocyte; neonates: AAF/PH	GGT+	NT	Hayes et al., 1985
2,2',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (PCB 47)	DEN for 12 days	0.2 or 0.4 nmol/kg/week PCB for 7 weeks	NR	+	Oesterle and Deml, 1983
2,2',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (PCB 47)	PH/DEN	100 mg/kg of PCB in diet for 27 weeks	GGT+	+	Preston et al., 1985
2,2',4,5'-Tetrachlorobiphenyl (PCB 49)	Newborn rats: PCB (5 mg/kg/day) for 3 weeks or single dose DEN	50 mg/kg/week of PCB for 8 weeks (only after DEN initiation)	ATP-	+	Rose et al., 1985
2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl (PCB 52)	3 oral doses of 400 μ mol/kg PCB weekly for 3 weeks	Resistant hepatocyte; neonates: AAF/PH	GGT+	NT	Hayes et al., 1985
2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl (PCB 52)	DEN for 12 days	0.2 or 0.4 nmol/kg/week PCB for 7 weeks	NR	+	Oesterle and Deml, 1981
2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl (PCB 52)	PH/DEN	100 mg/kg of PCB in diet for 27 weeks	GGT+	+	Preston et al., 1985
2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl (PCB 52)	Single dose DEN to female weanlings	64 mg/kg of PCB once weekly for 7 weeks	ATP-	+/-	Deml et al., 1985
2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl (PCB 101)	DEN for 10 days	50 or 150 μ mol/kg/week of PCB for 8 or 16 weeks	ATP- GSTP+	+/-	Kunz et al., 2006
2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 153)	3 oral doses of 400 μ mol/kg PCB weekly for 3 weeks	Resistant hepatocyte; neonates: AAF/PH	GGT+	NT	Hayes et al., 1985
2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 153)	Newborn rat: PCB (5 mg/kg/day) for 3 weeks or single dose of DEN	50 mg/kg/week of PCBs for 8 weeks (only after DEN initiation)	ATP-	+	Rose et al., 1985
2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 153)	DEN in drinking water for 10 days	ip injection (150 μ mol/kg) of PCB once weekly for 8 weeks	ATP-	+	Buchmann et al., 1986

Note. AAF—2-acetylaminofluorene; ATP—adenosinetriphosphatase; DEN—diethyl-N-nitrosamine; GGT—gamma-glutamyltranspeptidase; GSTP—glutathione-S-transferase P; NR—not reported; PH—partial hepatectomy.

Tab. 5 Studi di promozione tumorale su fegato di ratto dopo trattamento con singoli congeneri di NDL-PCB (Knerr et al. 2006).

La prima valutazione di rischio cancerogeno per i PCB fatta dall'EPA (*Environmental Protection Agency*) risale al 1987 e a quel tempo vi erano pochi e limitati dati sull'A1260, tuttavia già emergeva il potenziale cancerogeno di queste sostanze.

Nel 1996 fu poi completata la rivalutazione del rischio cancerogeno dei PCB. Ulteriori studi su altre miscele tecniche di PCB (A1016, A1242 e A1254) hanno portato allo loro classificazione come probabili cancerogeni per l'uomo (www.epa.gov/pcbs/pubs/effects.htm).

Tale classificazione dei PCB viene confermata dalla IARC (*The International Agency for Research on Cancer*) che li categorizza come composti probabilmente cancerogeni per l'uomo, quindi appartenenti al gruppo 2A, sulla base di evidenze limitate negli esseri umani e sufficienti negli animali (IARC 1998).

Meccanismo d'azione dei PCB

L'attività dei PCB, ed in particolare dei PCB dioxin-like, è legata, per molti versi, all'azione del recettore cellulare AhR, una proteina solubile intracellulare in grado di legarsi a numerose sostanze aromatiche. Il recettore Ah possiede caratteristiche biochimiche affini ai recettori per gli ormoni steroidei, anche se per ora non è stata individuata una molecola endogena specifica che vi corrisponda: la sua struttura è comunque molto simile a quella dei

recettori per i glucocorticoidi. Allo stato libero è reperibile sia nel citosol che nel nucleo, apparentemente in condizioni di equilibrio (Denison et al. 1986), complessato con almeno 3 proteine aggiuntive (Perdew 1992).

I PCB che si trovano nei tessuti allo stato libero diffondono liberamente all'interno delle cellule incontrando il recettore Ah. A questo punto si susseguono una serie di trasformazioni non ancora del tutto chiarite, ma che comportano il rilascio di hsp90 ("heat shock protein" da 90 kDa) e di altre proteine. Il complesso, analogo a quello che si formerebbe se ci fosse la diossina, attraverso queste trasformazioni, acquista la capacità di legarsi ad una proteina nucleare, chiamata ARNT (*Ah Receptor Nuclear Translocator*) (Dolwick 1993; Hoffman 1991). Il complesso che si viene a formare possiede una elevata affinità per alcune sequenze di DNA, le DRE (*Dioxin Responsive Elements*), situate nelle adiacenze di vari geni, tra cui il CYP1A1, che regola la sintesi del citocromo microsomale P-450 e l'attività della correlata monossigenasi AHH (*Aryl Hydrocarbon Hydroxylase*) (Withlock 1990). I DL-PCB determinano, quindi, una induzione del CYP1A1.

Per quanto riguarda il meccanismo di azione dei PCB non dioxin-like, questi possono avere attività estrogenica o antiestrogenica; alcuni vanno ad interagire con il recettore degli estrogeni (ER), ma i meccanismi non sono ancora del tutto chiariti (Oh et al. 2007).

La produzione di ROS sembra essere un tratto comune a tutti i congeneri, anche se l'entità del fenomeno e i

meccanismi responsabili sono diversi. In uno studio comparativo condotto su cellule di tumore mammario umano, i PCB, sia con struttura planare che non planare, si sono dimostrati capaci di indurre ROS in maniera tempo e dose-dipendente. Si è anche osservata deplezione di NADPH abrogata da inibitori della proteina PARP (*poly ADP-ribose polymerase*); poiché PARP (importante mediatore di meccanismi riparativi) è attivata con consumo di NADPH in seguito a formazione di rotture del DNA, questa osservazione costituisce un'evidenza indiretta della induzione di queste rotture da parte dei PCB (Lin et al. 2006). I congeneri mono, di e tri-clorurati sono maggiormente metabolizzati e sono quelli più probabilmente coinvolti nella formazione di addotti al DNA in vivo (Pereg et al. 2003, McLean et al. 1996).

Altri possibili effetti legati, invece, ai PCB non-planari sono il danno alle membrane e frammentazione cellulare, così come l'induzione di CYP2B (ISSN 1123-3117 Rapporti ISTISAN 07/50).

I congeneri non-planari possono fungere da promoventi, ma i meccanismi alla base di questa attività sono diversi. Nel caso del PCB 153 (2,2',4,4',5,5', esaclorodifenile) è stata dimostrata la capacità di indurre in topo l'espansione clonale di cellule epatiche mutate nella β -catenina, analogamente al noto promotore Fenobarbital (Borlak et al. 2003). Altri congeneri sembrano favorire la metastatizzazione aumentando la permeabilità endoteliale e favorendo in questo modo la trasmigrazione di cellule di tumore mammario attraverso l'endotelio: il fenomeno è mediato

dalla induzione del fattore VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) (Strathmann et al. 2006).

I dati disponibili sembrano evidenziare altre attività sui meccanismi di differenziazione e divisione cellulare, sulle interazioni con fattori di crescita, sul metabolismo di alcuni ormoni, ad es. l'aumento della deplezione epatica dell'ormone tiroideo T4 attraverso l'induzione dell'enzima UGT (UDP-glucuronosiltransferasi): l'insieme di queste azioni porta al manifestarsi di conseguenze assai diverse a seconda della specie animale, della razza, del sesso e dell'età del soggetto coinvolto, nonché del tipo di cellula esposta all'azione dell'agente tossico (ISSN 1123-3117 Rapporti ISTISAN 07/50).

IL TEF

I PCB, in genere, sono presenti nell'ambiente contemporaneamente ad altri inquinanti quali le policlorodibenzodiossine (PCDDs) e i policlorodibenzofurani (PCDFs); la complessa natura di queste molecole non facilita certo la valutazione del rischio per uomo, fauna e pesci. A tale proposito nel corso di diversi anni è stato introdotto e migliorato il concetto di "Fattore di Tossicità Equivalente" o TEF (Safe 1998, Van den Berg et al. 2006).

Il TEF esprime il grado di tossicità di ciascun congenere assumendo, come valore di riferimento, la

tossicità del 2,3,7,8-tetraclorodibenzodiossina (TCDD) comunemente nota come diossina. Il valore di TEF può essere utilizzato per la valutazione del rischio di tossicità da PCB sull'uomo in quanto il meccanismo attraverso il quale DL-PCB e TCDD determinano effetti tossici è comune.

I criteri che permettono l'assegnazione di un valore di TEF ai diversi congeneri sono:

- struttura in relazione con PCDDs e PCDFs
- capacità di legame con l'AhR
- effetti tossici e biochimici simili alla diossina
- persistenza e capacità di accumulo nella catena alimentare.

I valori di TEF associati ai diversi composti sono rappresentati in tabella 6. I dati riportati sono quelli stabiliti nel 1998 dalla *World Health Organization* (WHO) con le successive modifiche relative al 2005. Tali variazioni sono determinate dal fatto che i valori ultimi più recenti sono stati calcolati facendo riferimento anche a matrici ambientali abiotiche come suoli, sedimenti, rifiuti industriali ecc (Van den Berg et al. 2006).

Compound	WHO 1998 TEF	WHO 2005 TEF
Chlorinated dibenzo- <i>p</i> -dioxins		
2,3,7,8-TCDD	1	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0.01	0.01
OCDD	0.0001	0.0003
Chlorinated dibenzofurans		
2,3,7,8-TCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8-PeCDF	0.05	0.03
2,3,4,7,8-PeCDF	0.5	0.3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0.1	0.1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0.1	0.1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0.01	0.01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0.01	0.01
OCDF	0.0001	0.0003
Non- <i>ortho</i> -substituted PCBs		
3,3',4,4'-tetraCB (PCB 77)	0.0001	0.0001
3,4,4',5-tetraCB (PCB 81)	0.0001	0.0003
3,3',4,4',5-pentaCB (PCB 126)	0.1	0.1
3,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB 169)	0.01	0.03
Mono- <i>ortho</i> -substituted PCBs		
2,3,3',4,4'-pentaCB (PCB 105)	0.0001	0.00003
2,3,4,4',5-pentaCB (PCB 114)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5-pentaCB (PCB 118)	0.0001	0.00003
2',3,4,4',5-pentaCB (PCB 123)	0.0001	0.00003
2,3,3',4,4',5-hexaCB (PCB 156)	0.0005	0.00003
2,3,3',4,4',5'-hexaCB (PCB 157)	0.0005	0.00003
2,3',4,4',5,5'-hexaCB (PCB 167)	0.00001	0.00003
2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB (PCB 189)	0.0001	0.00003

Tab. 6 Valori di TEF, WHO 1998 e WHO 2005

Altro parametro strettamente legato al TEF è il TEQ, fattore di tossicità equivalente riferito a miscela di diossina, dibenzofurani e PCB, tale parametro si calcola secondo la formula di seguito riportata.

$$\text{TEQ} = \sum_{n1} [\text{PCDD}_i \times \text{TEF}_i] + \sum_{n2} [\text{PCDF}_i \times \text{TEF}_i] \\ + \sum_{n3} [\text{PCB}_i \times \text{TEF}_i]$$

Per avere un'idea più chiara di TEF e TEQ si può dire, in generale, che il TEF è un parametro utile a valutare la potenziale tossicità di ciascun congenere legata anche all' "intake" giornaliero, mentre il TEQ è più correttamente utilizzato per la valutazione tossicologica in rapporto a matrici ambientali, e tiene in considerazione il fatto che nei diversi comparti ambientali (aria, suoli ecc.) i vari congeneri presenti hanno proprietà diverse e quindi destini diversi (Van den Berg et al. 2006).

Secondo alcuni studi, attraverso un metodo computazionale, è possibile associare un valore di TEF a tutti i congeneri in rapporto alla loro affinità con il recettore Ah, naturalmente i valori di TEF per i congeneri NDL sono sensibilmente più bassi rispetto a quelli dei congeneri DL (Kafafi et al. 1993).

La legislazione

Con il D.P.R. 24 maggio 1988, n. 216 vi è l'attuazione della direttiva CEE numero 85/467 recante sesta modifica (PCB/ PCT) della direttiva CEE n. 76/769. Tale direttiva riguarda il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentari ed amministrative degli

Stati membri relative alle restrizioni in materia di immissione sul mercato e di uso di talune sostanze e preparati pericolosi, ai sensi dell'art. 15 della legge 16 aprile 1987, n. 183.

La direttiva europea 96/59/CE concernente lo smaltimento dei policlorodifenili e dei policlorotrifenili (PCB/PCT) abroga la precedente legislazione riformulando la definizione di PCB e riclassificando impianti ed apparecchiature contenenti tali sostanze non solo in base alla concentrazione di PCB ma anche in relazione al rischio di dispersione nell'ambiente.

Aspetti salienti di questa direttiva sono:

- introduzione di un limite temporale per l'eliminazione dei PCB (31/12/2010)
- deroga alla scadenza del 2010 per gli apparecchi i cui fluidi contengano concentrazioni di PCB inferiori a 50 ppm (0,005%), consentendone lo smaltimento al termine della loro vita operativa
- introduzione di un censimento obbligatorio per gli apparecchi contenenti PCB in percentuale superiore allo 0,005% e che abbiano un volume superiore a 5 dm³
- promozione della revisione e decontaminazione degli impianti e delle apparecchiature contenenti PCB, ancora in esercizio.

Il D.Lgs 209/99 si pone l'obiettivo della definitiva eliminazione dei PCB attraverso lo smaltimento o la decontaminazione degli apparecchi isolati in PCB o con

altri oli da essi contaminati. Lo stesso decreto impone a tutti i detentori di apparecchi contenenti PCB, per un volume superiore a 5 dm³ (o contenenti più di 5 litri di olio contaminato), di darne comunicazione di possesso alle Sezioni del Catasto Rifiuti di Regioni o Province Autonome di appartenenza.

Il decreto attuativo dell'11 ottobre 2001, emanato dal Ministero dell'Ambiente di concerto con il Ministero delle Attività Produttive, ha successivamente stabilito le "Condizioni per l'utilizzo dei trasformatori contenenti PCB in attesa della decontaminazione o dello smaltimento".

Per quanto riguarda, invece, la valutazione dei siti inquinati, il tipo di approccio è cambiato nel corso degli anni.

Negli anni '80 l'analisi dei PCB era essenzialmente riferita ad Aroclor singoli o in miscela sia per l'identificazione (riconoscimento del pattern) che per la quantificazione.

Allo stato attuale si ritiene che una corretta valutazione di questi composti, sia in termini quantitativi che di comparabilità dei dati, possa essere fatta solamente con un approccio congenere-specifico, utilizzando possibilmente tecniche spettrometriche. Tale scelta facilita sia la quantificazione che la comparabilità dei dati tra i diversi studi ambientali.

La ricerca di congeneri specifici è anche promossa dalle normative ambientali emanate negli ultimi anni, anche se il pool di PCB richiesto può essere diverso da

norma a norma (REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006 DELLA COMMISSIONE del 19 dicembre 2006).

Tenendo presente che con la dieta l'assunzione giornaliera media dei NDL-PCB si può stimare nell'ordine di 10-45 ng/Kg b.w. al giorno, arrivando, nei bambini, fino a 27-50 ng/Kg b.w. (www.efsa.europa.eu) mentre per i DL-PCB si parla di 1.2 - 3.0 pg WHO TEQ/Kg b.w. al giorno (*European Commission. Scientific Committee on Food. 2000.*) si sono stabiliti dei limiti di legge sui PCB totali che in Italia sono:

- SEDIMENTI: 1.5 pg/g
- ACQUE: 0.01 µg/L
- ALIMENTI: 2-12 pg/g grasso (diossine e DL-PCB).

Considerando che il dato analitico può essere espresso in termini di tal quale o su peso fresco, o peso secco o grasso, è chiaro che passando da un dato all'altro bisogna che sia nota la % d'acqua o % di lipidi nel campione.

Attualmente negli alimenti e nei mangimi vengono eseguite delle ricerche diverse tra i NDL-PCB:

- Somma di 3 congeneri (PCB 138, 153, 180)
- Somma di 6 congeneri (PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180) chiamati indicatori
- Somma di 7 congeneri (indicatori + il PCB 118).

Questo perché la somma dei 6 PCB indicatori rappresenta il 50% circa di tutti i NDL-PCB presenti negli alimenti.

Per quanto riguarda l'Italia, nello specifico, la ricerca viene effettuata o sui DL-PCB o su un mix di 18 congeneri, questi sono stati scelti seguendo le linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità (2001), che consiglia la loro determinazione in campioni ambientali e alimentari sottoposti ad analisi chimica; tale MIX è costituito dai congeneri che sono considerati tra i più rappresentativi, si veda la tabella 6.

PCB	Sostituenti Cl	TEF EPA	Dioxin-like
PCB 28	(2 4 4')		No
PCB 52	(2 2' 5 5')		No
PCB 95	(2 2' 3 5' 6)		No
PCB 99	(2 2' 4 4' 5)		No
PCB101	(2 2' 4 5 5')		No
PCB 105	(2 3 3' 4 4')	0.0001	Si
PCB 110	(2 3 3' 4' 6)		No
PCB 118	(2 3' 4 4' 5)	0.0001	Si
PCB 138	(2 2' 3 4 4' 5')		No
PCB 146	(2 2' 3 4' 5 5')		No
PCB 149	(2 2' 3 4' 5' 6)		No
PCB 151	(2 2' 3 5 5' 6)		No
PCB 153	(2 2' 4 4' 5 5')		No
PCB 170	(2 2' 3 3' 4 4' 5)	0.0001	No
PCB 177	(2 2' 3 3' 4' 5 6)		No
PCB 180	(2 2' 3 4 4' 5 5')	0.00001	No
PCB 183	(2 2' 3 4 4' 5' 6)		No
PCB 187	(2 2' 3 4' 5 5' 6)		No

Tab. 6 Congeneri presenti nel MIX dei 18 e loro caratteristiche (Ahlborg et al. 1994, Kafafi et al. 1993, Van den Berg et al. 1998).

I congeneri che fanno parte del mix presentano alcune caratteristiche non trascurabili, ad esempio i PCB 138, 153, 180 sono quasi sempre riscontrati e quantitativamente dominanti nel tessuto adiposo umano e nel latte materno, tenendo conto del fatto che il PCB 138 e il 153 rappresentano il 40-60% dei congeneri totali. Anche il PCB 28, 118, 170 sono spesso riscontrati in elevate quantità ed i congeneri coplanari 77, 126, 169 danno un contributo importante dal punto di vista tossicologico (Hansen 1998).

Approccio metodologico

Lo studio dei possibili effetti cancerogeni delle molecole in esame è stata effettuata mediante test di trasformazione *in vitro* su cellule BALB/c 3T3. Queste cellule sono una linea stabilizzata ipotetraploide di fibroblasti embrionali murini adattati alla crescita *in vitro* (immortalizzati). Non possono essere considerate cellule completamente normali visto che il processo di immortalizzazione ha determinato l'insorgenza di aneuploidia e di una certa eterogeneità cellulare; esse dunque hanno già compiuto alcune tappe del processo di trasformazione. Tale linea cellulare ha però conservato, in maniera specifica e costante, caratteristiche essenziali proprie delle cellule normali quali crescita dipendente da ancoraggio e soggetta ad inibizione da contatto ed assenza di tumorigenicità.

Il trattamento con un composto chimico o una miscela di composti cancerogeni determina l'insorgenza di cloni di cellule trasformate (*foci*), il cui fenotipo è chiaramente maligno. La frequenza di trasformazione è, in genere, una funzione della dose di trattamento e segue un andamento tipico di un evento raro (distribuzione di Poisson), in linea con la possibilità di insorgenza di un tumore *in vivo*.

I test di trasformazione cellulare *in vitro* si prestano allo studio di singoli composti chimici, miscele complesse, o associazioni e sono in grado di fornire informazioni sul ruolo che essi hanno nelle differenti tappe del processo di cancerogenesi. La struttura stessa del test consente di programmare l'esposizione delle cellule al cancerogeno scelto sia in momenti

differenti del processo multifasico di trasformazione che per tempi differenti.

La trasformazione cellulare *in vitro* su cellule BALB/c 3T3, analogamente alla cancerogenesi multifasica *in vivo*, consente di verificare sia la capacità trasformante di un composto, anche non genotossico, o di una miscela di composti, risultando quindi strumento idoneo ad evidenziare alterazioni genetiche e danni epigenetici indotti da cancerogeni chimici.

I carcinomi della mammella sono tra le più diffuse forme tumorali nei paesi industrializzati e tra le principali cause di morte dopo la neoplasia polmonare. Hanno un'origine multifattoriale che include profilo genico, dieta e stile di vita. Tra gli eventi fortemente correlati all'insorgenza delle patologie sono stati individuati alterazioni di oncogeni e mutazioni a livello di geni oncosoppressori, come BRCA-1 e BRCA-2 (Poplawsky et al. 2005, Mols et al. 2005, Svec 2005).

Per questi motivi alla linea cellulare di fibroblasti murini sono state affiancate linee cellulari di carcinoma mammario per poter valutare meccanismi d'azione a livello funzionale e genico-molecolare mediante lo studio di *endpoint* significativi probabilmente coinvolti nell'attività tumorale (tabella 1).

LINEA CELLULARE	CARATTERISTICHE	TEMPO DI RADDOPPIAMENTO (hr)	ER
MCF-7	Adenocarcinoma mammario, Differenziate, Non metastatiche	61	Risposta funzionale estrogeni positiva; mRNA per ER α mRNA per ER β
T47D	Adenocarcinoma mammario, metastatiche	32	Recettori per androgeni estrogeni progesterone Ah

Tab. 1 Caratteristiche delle linee cellulari utilizzate nello studio

Lo studio si è articolato nell'allestimento di prove funzionali *in vitro* ed indagini di tipo molecolare. Come modelli sperimentali validi per l'analisi del potenziale tossico dei composti così come dell'eventuale modulazione dell'attività proliferativa, sono stati utilizzati vari saggi. Intraprendere uno studio sperimentale sull'attività di una sostanza cancerogena richiede la conoscenza del potenziale profilo tossicologico e del *range* di concentrazioni entro il quale la si può utilizzare per approfondire e studiare gli effetti biologici. Il test di citotossicità mette in risalto gli effetti citotossici di un ampio intervallo di concentrazioni di agenti presi in esame sia singolarmente che in combinazione. Il test di vitalità consente una valutazione più approfondita e completa dell'effetto a breve termine sulla crescita indotto dalle molecole oggetto di

studio, i tempi stabili sono 24, 48, 72 ore e 6 giorni di trattamento.

Attraverso il saggio di E-screen si mettono in evidenza possibili effetti estrogenici delle molecole in esame. Il test viene condotto in maniera analoga al test di vitalità, tuttavia con l'accorgimento di utilizzare del siero "strippato", in cui viene eliminata parte della componente proteica. Si utilizza il 17 β -estradiolo come controllo positivo, promotore della crescita in cellule ER+, in un range di dosi estremamente ampio (0.05pM - 10nM), tale da permetterci di individuare la dose che induce l'incremento massimale del rate proliferativo. Per il saggio vengono utilizzate linee cellulari che esprimono i recettori per gli estrogeni.

Una volta ottenuto un quadro generale sui possibili effetti delle miscele grazie ai risultati dei test funzionali, è stata valutata la modulazione da parte delle molecole e/o di miscele delle stesse sull'espressione di geni coinvolti nella risposta ad estrogeni o a molecole diossino simili, andando ad effettuare un'analisi di tipo molecolare con Real-Time PCR (RT-PCR), analizzando nello specifico marcatori di pathway dell'*Aryl Hydrocarbon Receptor* (AhR) o dell'*Estrogen Receptor* (ER).

La RT-PCR, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR), è un metodo di amplificazione (reazione a catena della polimerasi o PCR) e quantificazione simultanee del DNA.

Tale tecnica, attraverso l'impiego di una molecola fluorescente, permette di monitorare l'andamento di una reazione ciclo dopo ciclo.

In una reazione tipica, il prodotto di PCR si raddoppia ad ogni ciclo dell'amplificazione. Il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base, è chiamato il ciclo soglia (valore di Ct). Il diagramma di Ct su DNA stampo è lineare, così un confronto dei valori di Ct fra reazioni multiple permette di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare. Il metodo utilizzato per il confronto tra trattato e controllo è quello del $2^{-\Delta\Delta Ct}$. In tale metodo si valutano le variazioni del valore del ciclo soglia dei geni di interesse normalizzati con il gene *house-keeping* GAPDH.

Tale tecnica presenta diverse applicazioni tra le quali determinare i cambiamenti nei livelli di mRNA valutando, per cellule di interesse, le modulazioni attraverso la comparazione dell'amplificazione di un gene tra campioni sperimentali e campioni di controllo (metodo comparativo). Altro tipo di approccio è misurare l'incremento dell'intensità del segnale durante la fase esponenziale dell'amplificazione andando a determinare l'ammontare di materiale genetico presente nella fase iniziale della reazione ottenendo così una quantificazione assoluta.

L'attività di ricerca si è poi focalizzata sull'utilizzo della tecnica del DNA-*microarray* per valutare la modulazione dell'espressione genica in risposta all'esposizione a contaminanti ambientali.

In questo modo è possibile definire i profili di espressione genica che sottendono a risposte biologiche

complesse nell'intento di individuare biomarcatori in grado di predire il rischio per l'uomo, e di consentire la stima di una relazione diretta tra l'esposizione e i possibili effetti.

Per lo studio dell'espressione genica, gli mRNA vengono prima estratti dalle cellule, convertiti in cDNA, con l'uso di un enzima chiamato "transcriptasi inversa" e allo stesso momento marcati con una sonda fluorescente. Quando si fa avvenire l'ibridazione fra la sonda presente sulla matrice e il cDNA target, quest'ultimo rimarrà legato alla sonda e può essere identificato semplicemente rilevando la posizione nel quale è rimasto legato.

Il principio che sta alla base di questa tecnica è molto semplice e risiede nella capacità che ogni acido nucleico a singolo filamento ha di appaiarsi al suo complementare, rispettando le regole di complementarità tra le basi: A-T, C-G.

Una volta che il *microarray* è stato costruito o comprato e il campione di acidi nucleici da analizzare è stato isolato, si fa avvenire la reazione di ibridazione, che permette la formazione degli etero duplex. Quindi dopo la marcatura con opportuni fluorocromi delle sequenze rappresentative dei geni in esame, i campioni possono essere depositati su supporto di varia natura (*slide*).

Per ottenere dei buoni *microarray* è essenziale difenderli dall'umidità (se l'ambiente è secco la soluzione evapora, se invece è umido si deposita dell'acqua) e dalla polvere (ogni spot è grande circa 50 micron, un granello di polvere è più grande di 50

micron, per cui può coprire vari spot), per questo motivo esistono delle camere apposite per l'ibridazione dei microarray che vengono sigillate. Dopo l'ibridazione il *microarray* viene lavato per rimuovere il cDNA che non si è legato.

Il vetrino a questo punto è pronto per il passaggio allo scanner dotato di laser in grado di eccitare i fluorocromi e misurarne l'intensità della fluorescenza, fornendo quindi un'analisi della relativa modulazione genica.

Vengono usati dei software appositi per convertire i segnali in una gamma di colori dipendente dalla loro intensità. Il segnale rilevato dallo scanner viene poi sottoposto ad altri algoritmi di filtrazione e di pulizia e convertito in valori numerici. Il principale problema dei *microarray* è la mancanza di standardizzazione, che causa difficoltà nel confronto di dati; inoltre, se oggi con questa tecnica è possibile analizzare i livelli di espressione di un singolo gene ottenendo degli ottimi risultati, la combinazione dello studio di molte migliaia di geni risulta molto complicato e può portare spesso a dei falsi positivi, questo accade anche a causa del fatto che alcuni cDNA possono *cross-ibridare* altre sonde (che avrebbero dovuto rilevare altri geni).

In ultimo, al fine di verificare l'applicabilità di *biomarkers* di espressione a situazioni di contaminazioni reali, ci si è focalizzati su campioni estratti da matrici ambientali, ed in particolare linee cellulari di interesse sono state esposte a sedimenti provenienti da siti inquinati.

L'approccio scelto per l'analisi degli effetti del campione ambientale è stato esclusivamente di tipo molecolare data l'impossibilità di effettuare i test funzionali preliminari a causa della scarsa quantità di campione stesso.

Materiali e metodi

Linee cellulari

Per le prove di tossicità e per la valutazione degli effetti trasformanti sono state utilizzate cellule BALB/c 3T3 clone A31 (*American Type Culture Collection, MD, USA*) in fase di crescita esponenziale, mantenute in coltura in D-MEM (*Dulbecco's modified Eagle's minimal medium*) con l'aggiunta del 10% di siero (*Newborn Calf Serum, GIBCO*).

Per la valutazione dell'attività di interferenza endocrina e l'analisi molecolare in RT-PCR sono state utilizzate due linee cellulari di adenocarcinoma mammario, le MCF7 e le T47D. Le prime crescono in terreno D-MEM con il 10% di FCS (*Fetal Calf Serum, GIBCO*) le seconde sono state mantenute in RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*) 10% FCS addizionato con insulina (0.2 U/ml). Per l'analisi in *microarray* sono state utilizzate le cellule BALB/c 3T3 clone A31.

Composti utilizzati

L'A1260 veicolato in esano è stato acquistato presso Supelco (Sigma-Aldrich), in ampolle da 1 ml, con una concentrazione di partenza di 1000 mg/ml.

La polvere di A1260 (purezza 99%) è stata ottenuta da LGC Promochem (Wesel, Germany) e successivamente è stata sciolta in dimetilsolfossido (DMSO) in modo tale

da ottenere una soluzione madre di 33 mM (Sánchez-Alonso et al. 2004).

I congeneri, acquistati da Labservice Analitica (tutti certificati ad eccezione del 95, 99, 110, 149, 151, 177, 183) e che sono elencati in tabella 1, sono stati sciolti in DMSO in modo da avere, per ciascuno, una soluzione madre di 33 mM (Sánchez-Alonso et al. 2004). Sono stati uniti successivamente per andare a costituire un MIX equimolare in cui ciascun congenere è presente ad una concentrazione finale di 1.83 mM.

PCB	CAS N.	Formula
PCB 28	7012-37-5	C ₁₂ H ₇ Cl ₃
PCB 52	35693-99-3	C ₁₂ H ₆ Cl ₄
PCB 95	38379-99-6	C ₁₂ H ₅ Cl ₅
PCB 99	38380-01-1	C ₁₂ H ₅ Cl ₅
PCB101	37680-73-2	C ₁₂ H ₅ Cl ₅
PCB 105	32598-14-4	C ₁₂ H ₅ Cl ₅
PCB 110	38380-03-9	C ₁₂ H ₅ Cl ₅
PCB 118	31508-00-6	C ₁₂ H ₅ Cl ₅
PCB 138	35065-28-2	C ₁₂ H ₄ Cl ₆
PCB 146	51908-16-8	C ₁₂ H ₄ Cl ₆
PCB 149	38380-04-0	C ₁₂ H ₄ Cl ₆
PCB 151	52663-63-5	C ₁₂ H ₄ Cl ₆
PCB 153	35065-27-1	C ₁₂ H ₄ Cl ₆
PCB 170	35065-30-6	C ₁₂ H ₃ Cl ₇
PCB 177	52663-70-4	C ₁₂ H ₃ Cl ₇
PCB 180	35065-29-3	C ₁₂ H ₃ Cl ₇
PCB 183	52663-69-1	C ₁₂ H ₃ Cl ₇
PCB 187	52663-68-0	C ₁₂ H ₃ Cl ₇

Tab. 1 Congeneri facenti parte del Mix dei 18.

Campionamento e caratterizzazione dei campioni ambientali

Il sedimento identificato nello studio come Crevalcore proviene da un canale di bonifica utilizzato a fini irrigui e contaminato in seguito a fuoriuscita di olii minerali provenienti da un impianto industriale e riversati nella rete fognaria e da questa nel canale stesso.

Le analisi, eseguite da ARPA Emilia Romagna immediatamente dopo l'episodio di inquinamento, su una serie di campionamenti dei sedimenti eseguiti lungo l'asta del canale, hanno confermato la contaminazione dei sedimenti da Idrocarburi pesanti e da PCB con massima concentrazione rilevata in corrispondenza dello scarico pari a 0.085 mg/kg.

Per la sperimentazione in oggetto, i sedimenti sono stati prelevati a valle del punto di contaminazione con strumento di campionamento per una profondità di cm. 40 in centro canale e a bordo canale.

La preparazione del campione di sedimento prevede: essiccamento a 40°C o a temperatura ambiente, macinazione e setacciatura al vaglio di 2 mm. I risultati delle analisi sono riferiti a sostanza secca e alla frazione granulometrica passante per il vaglio 2 mm.

L'estrazione del campione è stata effettuata con il sistema ASE (*accelerated solvent extractor*) con N°2 cicli alle seguenti condizioni:

- temperatura forno: 120°C
- solvente: miscela esano/diclorometano 1:1
- tempo di statica: 10 minuti
- flush volume: 60%
- purge: 60 sec

Gli estratti ottenuti vengono sottoposti a due purificazioni successive attraverso colonna multistrato e allumina. La frazione raccolta viene analizzata in spettrometria di massa.

Per il controllo dell'intero processo analitico si utilizzano campioni certificati di sedimento prodotto dalla NWRI (*National Water Research Institute*).

Tutto il terreno rimasto dopo l'analisi qualitativa (30 g per ogni campione) è stato sottoposto a estrazione, dopo avere unito i campioni prelevati al centro (88.55 ng/g di peso secco) e al bordo (187.55 ng/g di peso secco) del canale, al fine di ottenere il massimo quantitativo di PCB totali estraibili dal terreno per effettuare le analisi biologiche.

In fig. 1 è rappresentato il quantitativo totale per ciascun PCB facente parte del MIX dei 18 congeneri.

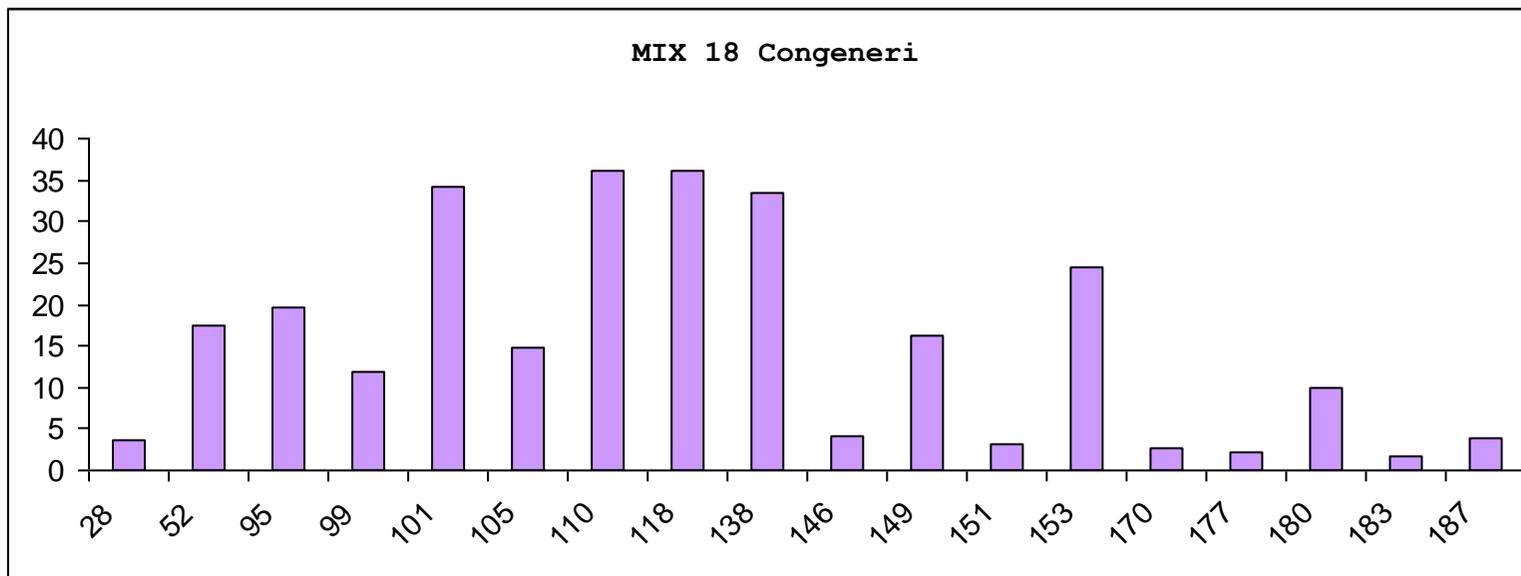
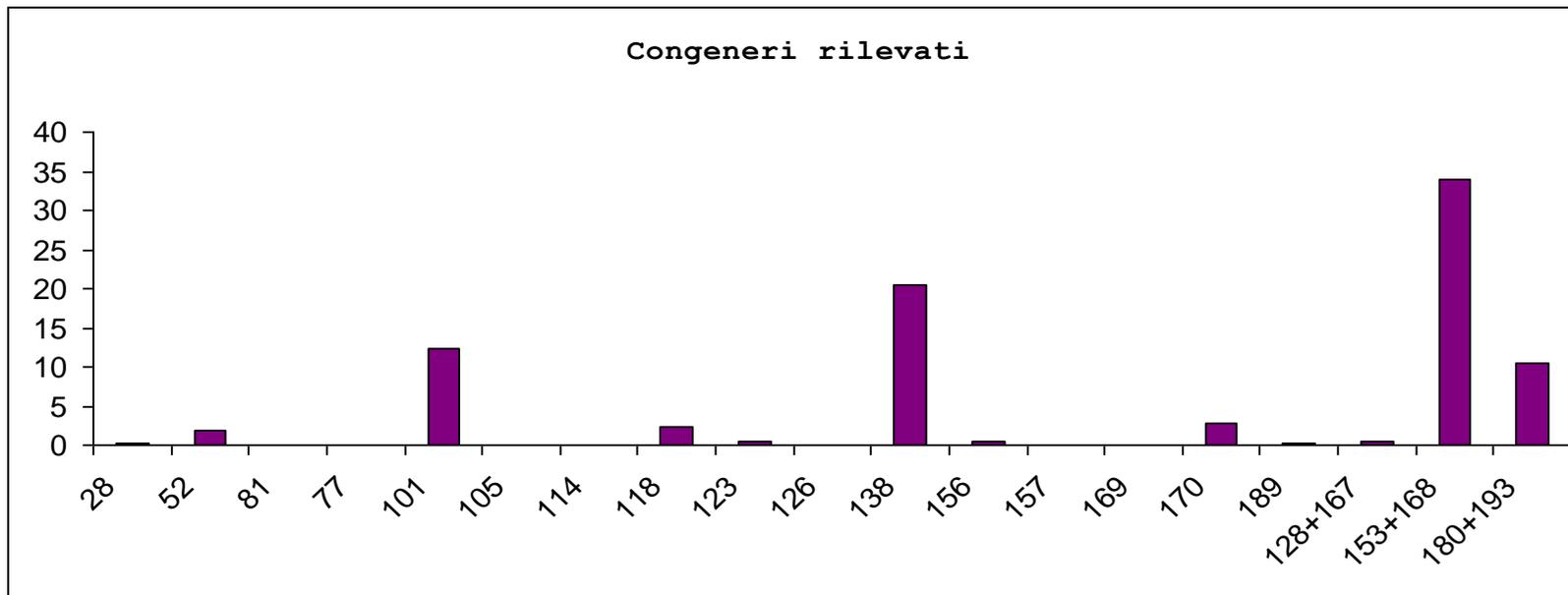


Fig. 1 Analisi dettagliata dei congeneri facenti parte del mix dei 18 rilevati nei campioni di sedimento, i dati sono la somma dei valori di contaminazione dal bordo e dal centro del canale di Crevalcore a valle del punto di contaminazione, valori in ng/g di peso secco.

Il campione Chiaro Magni (CM) proviene invece dalla campagna di monitoraggio ambientale delle acque di transizione della regione Emilia Romagna, ed è stato prelevato in una piallassa del ravennate.

Il metodo di estrazione è uguale a quello utilizzato per il campione di Crevalcore.

In tab. 2 è rappresentato il quantitativo per ciascun PCB ricercato, i congeneri sono stati scelti per questo campione seguendo le linee guida del decreto ministeriale 367/03 e quelli indicati dal WHO. Alcuni congeneri sono presenti come sommatoria in quanto non rilevabili singolarmente dalla strumentazione analitica in uso.



Tab. 2 Congeneri rilevati sul campione di sedimento Chiaro Magni, valori in ng/g di peso secco.

Test di citotossicità

Il test viene utilizzato per valutare il profilo tossicologico di una determinata sostanza in vitro e per individuare degli intervalli di dosi da utilizzare in studi successivi.

Le cellule, in crescita esponenziale, vengono seminate ad una densità di 250 cellule/piastra, in piastre Petri (*Falcon Tissue Culture Dish, Becton Dickinson, England*) da 60 mm Ø, 5 per trattamento, ed incubate nelle condizioni di coltura standard.

A 48 ore dalla semina le cellule vengono esposte all'azione di varie dosi dei composti in esame. Cellule non trattate e cellule trattate con il solo solvente (DMSO 0.5%) vengono utilizzate come controlli negativi. Al termine del periodo di trattamento, che ha una durata complessiva di 48 ore, si effettua un lavaggio con tampone salino *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (PBS, GIBCO BRL, USA), e si mantengono le cellule in coltura in presenza di 3 ml di terreno completo, sostituito 2 volte alla settimana per tutta la durata del test.

Il test ha una durata complessiva di 10-12 giorni, dopo i quali le piastre vengono fissate con metanolo e colorate con *Giemsa* 10%.

In ciascuna piastra vengono contate le colonie con più di 50 cellule. I dati vengono espressi come numero medio di colonie per piastra \pm errore standard (E.S.); efficienza clonale assoluta (ECA), ovvero il rapporto tra il numero di colonie nella piastra ed il numero di

cellule seminate; efficienza clonale relativa (ECR), espressa in percentuale, che viene ottenuta dal rapporto tra la media delle colonie nel gruppo di trattamento e quella nel gruppo di controllo, costituito da cellule trattate con DMSO allo 0.5%.

Test di trasformazione

Il test di trasformazione in vitro consente la valutazione della capacità trasformante sia di un composto singolo che di miscele complesse, anche non genotossiche, permettendo inoltre di discriminare tra attività iniziante ed attività promovente.

La struttura del test consente di programmare l'esposizione delle cellule al cancerogeno scelto sia in momenti differenti del processo multifasico di trasformazione che per tempi differenti.

Le cellule BALB/c 3T3 in crescita esponenziale vengono seminate in piastre da 60 mm Ø ad una densità di 3×10^4 cellule/piastra, 10 repliche per trattamento. Vengono allestite piastre non trattate e piastre trattate con il solo solvente, che fungono da controllo negativo; vengono, inoltre, seminate piastre di controllo positivo trattate con 3-metilcolantrene (3-MCA) ad una concentrazione di 2.5 µg/ml, che risulta essere trasformante nelle condizioni sperimentali utilizzate; infine si considerano le piastre per i trattamenti dei composti di interesse alle concentrazioni stabilite.

Vengono scelte 3-5 dosi in rapporto ai risultati ottenuti nel test di citotossicità; l'intervallo delle concentrazioni da saggiare deve comprendere:

- dose elevata che causa una riduzione dell'80-90% sull'efficienza clonale relativa
- dose bassa con effetto nullo sull'efficienza clonale relativa
- dosi intermedie.

Se la sostanza da saggiare non è tossica e facilmente solubile, si usano concentrazioni fino a un massimo di 5 mg/ml o 10 mM. Per sostanze non tossiche e insolubili, la dose più alta da saggiare sarà condizionata dal limite visibile di solubilità nel mezzo completo.

L'incubazione viene protratta per 48 ore in D-MEM addizionato di siero NCS al 10%. Al termine del periodo di trattamento si effettua un lavaggio con PBS, e si mantengono le cellule in coltura in presenza di 3 ml di terreno completo; anche in questo caso il terreno viene sostituito 2 volte alla settimana per tutta la durata del test, che ha una durata complessiva di 4-6 settimane. Al termine del periodo di incubazione le piastre vengono fissate con metanolo, colorate con *Giemsa* 10% e esaminate al microscopio ottico al fine di valutare la comparsa di foci di trasformazione. Parallelamente al test di trasformazione viene condotto un test di citotossicità allo scopo di determinare la frazione di cellule sopravvissuta al trattamento chimico.

Esame e conta dei foci

Vengono contati soltanto i *foci* inequivocabilmente positivi (tipo III). Le caratteristiche che li distinguono sono un diametro superiore ad 1 mm, un'intensa basofilia e l'essere costituiti da cellule a disposizione casuale, pluristratificate, con atteggiamento infiltrante nei confronti del monostrato circostante che, invece, presenta inibizione da contatto.

L'attività trasformante di un composto viene espressa come: frazione di piastre con *foci* per trattamento; numero medio di *foci* per piastra \pm E.S.; frequenza di trasformazione (TF), data dal rapporto tra il numero di *foci* per gruppo sperimentale ed il numero delle cellule a rischio, sopravvissute dopo il trattamento col composto, calcolato sulla base della efficienza clonale osservata nel test di citotossicità condotto in parallelo.

Test di vitalità a breve termine

Il test prevede che le cellule vengano seminate in *multiwell* da 96 pozzetti alla densità di 1000 cell/pz in un volume di 100 μ l. A 24 ore dalla semina le cellule vengono esposte ad un intervallo di

concentrazioni del composto in esame attraverso l'aggiunta di 100 µl di soluzioni di trattamento 2X.

A tempi prestabiliti (tempo zero di trattamento, 24, 48, 72 ore e 6 giorni) una *multiwell* viene sacrificata per valutare la proliferazione cellulare. Dopo aver eliminato il terreno di trattamento per rovesciamento della *multiwell*, ad ogni pozzetto vengono aggiunti 100 µl di terreno in cui è sciolto blu di tetrazolio (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT) ad una concentrazione pari a 0.5 mg/ml.

Dopo 4 ore di incubazione in termostato, il terreno contenente l'MTT viene eliminato, sempre per rovesciamento, e vengono aggiunti 100 µl per pozzetto di DMSO. Ciò consente l'eluizione e la solubilizzazione dei cristalli di formazano, formati dalla riduzione di MTT da parte delle cellule vitali.

A questo punto i valori di assorbanza ottenuti vengono rilevati mediante lettura alla lunghezza d'onda di 540/690 nm (Ascent).

I valori di inibizione percentuale della crescita (GI%) ai vari tempi sono stati calcolati con la formula elaborata dalla NCI:

$$(T-T_0) / (C-T_0) \times 100$$

dove T_0 è la densità ottica al tempo zero di trattamento, T e C sono le densità ottiche del trattato e del controllo. Il valore di GI_{50} , concentrazione in grado di indurre il 50 % di inibizione della crescita (*growth inhibitory concentration 50%*), ed il relativo errore standard, sono stati ricavati mediante analisi

di regressione lineare a partire dalla equazione della retta di interpolazione dei dati (<http://dtp.nci.nih.gov>).

Saggio di E-screen

Le cellule vengono seminate in *multiwells* da 24 pozzetti, 1 ml/pozzetto alla densità di 3×10^4 cellule/pozzetto. A 24 dalla semina, eliminato il terreno, si effettua un lavaggio con tampone salino (PBS). I composti vengono somministrati dopo diluizione in terreno de-estrogenato, ovvero privo di rosso fenolo e addizionato con siero "strippato" con charcol-destrano (CD). Il trattamento con CD elimina dal siero bovino oltre il 99% degli ormoni sessuali steroidei. In queste condizioni di coltura gli effetti proliferativi osservati dipendono dall'attività estrogenica propria del composto o della miscela con cui è stato eseguito il trattamento. Parallelamente ai trattamenti si allestiscono delle piastre in cui viene utilizzato come controllo positivo il 17β -estradiolo (E2), promotore della crescita in cellule ER+. La soluzione di E2 viene preparata al momento (1 mM in DMSO). Il range di dosi utilizzato va da 0.05 pM a 10 nM, in questo modo si ottiene una buona interpolazione della curva dose-risposta.

Il test è stato allestito in modo tale da poter contemporaneamente valutare possibili effetti estrogenici ed anti-estrogenici.

Dopo 5 giorni di trattamento si effettua un ulteriore lavaggio in PBS e le cellule vengono fissate e colorate con Crystal-violetto 0.2% in MetOH 20% per 10 min. Al termine del tempo stabilito si effettuano dei lavaggi con acqua e si attende che le piastre si asciughino.

Nell'ultima fase il colorante fissato nelle cellule viene disciolto con 500 µl di Sodiodecilsolfato (SDS) all'1% e dopo trasferimento in piastre *multiwell* da 96 pozzetti si valutano i valori di assorbanza mediante lettura in spettrometria visibile alla lunghezza d'onda di 540 nm (Ascent).

I dati vengono espressi come % rispetto alle colture di controllo trattate con E2.

Preparazione del lisato cellulare

La linea cellulare di interesse viene seminata in piastre da 60 mm Ø ad una densità di 6×10^5 cellule/piastra in terreno completo. Il giorno successivo si effettua un cambio di terreno dopo aver eseguito un lavaggio in PBS, e si somministra del terreno de-estrogenato.

Le cellule sono lasciate in incubatore per 48 ore poi trattate con i composti di interesse per 4 o 16 ore.

Allo scadere del tempo, le piastre vengono poste in ghiaccio e si effettuano due successivi lavaggi in PBS assicurandosi di eliminare ogni residuo di terreno di coltura. Si aggiunge direttamente in piastra una soluzione monofasica di fenolo acido e guanidina isotiocianato (*Trizol reagent*, Invitrogen) in quantità sufficiente in rapporto alla densità cellulare (300-500 µl). Si recupera il lisato cellulare dal fondo della piastra staccandolo meccanicamente utilizzando uno *scraper* e ponendo la sospensione in una provetta tipo *ependorf*.

Estrazione e quantificazione dell'RNA

A ciascun campione viene aggiunto un volume di cloroformio pari ad 1/5 del volume di *Trizol* utilizzato. Dopo un passaggio di ciascun campione al *vortex*, i campioni vengono lasciati per 5 min a temperatura ambiente e successivamente centrifugati per 15' a 9750 x g per ottenere una separazione in fasi da cui si è prelevata la fase acquosa (RNA totale). Un volume di Etanolo 70% pari al volume di fase acquosa recuperata viene aggiunto a ogni campione e il tutto viene trasferito in apposite colonnine di estrazione di acidi nucleici ("*Rneasy mini kit*", Qiagen). L'RNA di lunghezza superiore a 200 paia di basi rimane adsorbito sulla membrana di gel di silice contenuta nella colonna cromatografica, lavato con tamponi forniti nel kit,

quindi eluito con acqua RNase free 30 μ l e conservato a -80°C .

La concentrazione di RNA estratto è determinata mediante lo spettrofotometro NanoDrop 1000 che, utilizzando 1 μ l di campione, permette di determinare con accuratezza e precisione quantità di acidi nucleici fino a 3700 ng/ μ l senza diluizione.

Qualità dell'RNA

La qualità dell'RNA è stata valutata mediante *Bioanalyser* Agilent 2100 secondo la procedura fornita dal RNA 6000 *Nano Assay Kit* (Agilent Technologies), specifico per la valutazione dell'RNA totale eucariotico. Ogni RNA LabChip è costituito da un set di microcapillari nei quali viene polimerizzato un gel per la separazione dei frammenti di acido nucleico. Il software di cui è fornito il *Bioanalyser* traccia per ciascun campione un profilo elettroforetico dell'intera popolazione di RNA da cui si possono ricavare informazioni su eventuali degradazioni dell'acido nucleico misurando il rapporto delle aree dei picchi corrispondenti all'RNA ribosomiale 28S e 18S, e su eventuali contaminazioni date da proteine o DNA.

Retrotrascrizione

Un quantitativo pari a 1 µg di RNA totale è stato retrotrascritto a 50°C per 30' in 20 µl di una soluzione contenente una versione modificata di M-MLV maggiormente termostabile (*SuperScriptTM III Reverse Transcriptase*), un inibitore ricombinante di ribonucleasi (RNaseOUT), una concentrazione pari a 2.5 µM di oligo(dT), *random hexamers* (2.5ng/µl), MgCl₂ (10 mM), e NTPs (*SuperScriptTM III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR*, Invitrogen).

Preparazione dei primer

Le reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando la chimica SYBR Green che prevede l'uso di SYBR Green PCR (Invitrogen). Ciascun *primer* è stato ottimizzato per ciascuna reazione; le concentrazioni finali dei *primers* utilizzate nelle reazioni di amplificazione e la loro sequenza sono riassunte nella tabella 2.

Gene	Primer senso	Primer antisenso	senso (nM)	Anti senso (nM)
GAPDH Human	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C- 3'	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC- 3'	200	200
CYP1A1 Human	5'-AGG AGC TAG ACA CAG TGA TTG G-3'	5'-ACT TGT GTC TCT TGT TGT GCT G-3'	200	200
PDZK1 Human	5'-GCG AAT TGA GAA GGA CAC C-3'	5'-ACC AGA TCC ACA ACC TGC AT-3'	200	200

Tab. 2. Geni valutati in Real-Time PCR. Sono mostrate le sequenze e concentrazioni ottenute a seguito dell'ottimizzazione dei *primers*.

Sia per la GAPDH che per gli altri geni i *primer* sono stati disegnati utilizzando il software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>).

L'amplificazione è stata eseguita con lo strumento Biorad iCycler iQ. Tutti i campioni sono stati amplificati in triplicato e fatti correre su un gel al 2% d'agarosio al fine di confermare la specificità dei prodotti di PCR.

Real-Time PCR

2.5 ng di cDNA di ciascun campione vengono amplificati utilizzando 200 nM di *primer* specifici in 25 μ l di MIX contenente SYBR Green (*SYBR GreenER qPCR SuperMix for iCycler*, Invitrogen), secondo la procedura indicata dal produttore (50°C 2' 95°C 8', e 45 cicli di 95°C 15''). Il gene della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH), espresso in maniera costitutiva in tutte le cellule, verrà utilizzato per la normalizzazione.

Tutti i campioni per ogni gene vengono amplificati in triplicato.

L'analisi dei risultati è stata eseguita secondo il metodo comparativo, che consta delle seguenti formule matematiche:

$$Ct_{\text{campione}} - Ct_{\text{gapdh}} = \Delta Ct_{\text{campione}}$$

dove Ct_{campione} è il ciclo soglia (ovvero il punto in cui il prodotto specifico di PCR inizia ad essere rilevato) di ogni singolo gene di ciascun campione e Ct_{gapdh} è il ciclo soglia della GAPDH dello stesso campione.

Quindi si sottrae ad ogni ΔCt ottenuto ($\Delta Ct_{\text{campione}}$) quello del calibratore ($\Delta Ct_{\text{calibratore}}$) cioè quello derivato dalla linea cellulare usata come controllo (*reference*) e si calcola l'espressione relativa (ER) di ogni gene.

$$\Delta Ct_{\text{campione}} - \Delta Ct_{\text{calibratore}} = \Delta \Delta Ct$$

$$(ER) = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Si otterrà così l'espressione relativa di ogni gene normalizzato e calibrato con il proprio controllo (Livak et al. 2001)

Microarray

I passaggi principali della metodica sono sintetizzati in fig. 2

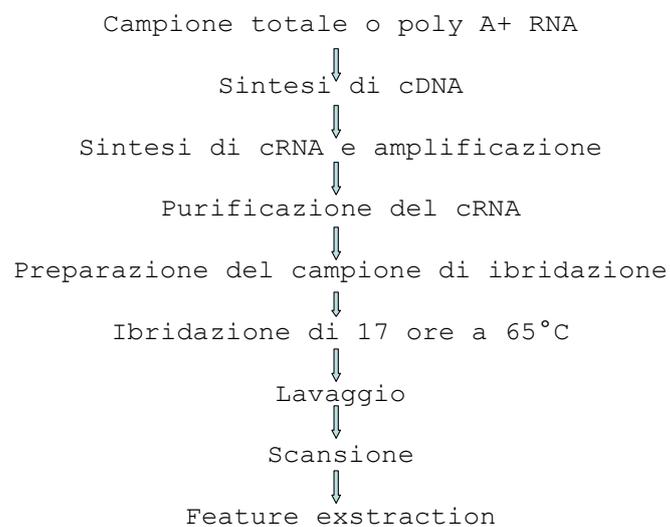


Fig. 2

Amplificazione lineare e sintesi di cRNA fluorescente

Il kit sviluppato da Agilent per la marcatura dei messaggeri combina una fase di retrotrascrizione a cDNA con una trascrizione/amplificazione a cRNA in presenza di CTP coniugato al fluorocromo cianina 3 (Cy3), consentendo di lavorare con quantità limitate di RNA totale (1 µg).

Nella retrotrascrizione, utilizzando *primer* poly-dT specifici, è possibile selezionare i mRNA dalla popolazione di RNA totale, poiché questa sottoclasse è l'unica che possiede al 3' una coda poly-A. L'innovazione del principio di sintesi risiede nella realizzazione di una retrotrascrizione selettiva a cDNA ad opera della retrotrascrittasi di *Mouse Moloney Leukemia Virus* (MMLV-RT) e con l'utilizzo di un *primer* sintetizzato in vitro e contenente, oltre alla sequenza di poly-dT, anche la sequenza del promotore per la polimerasi T7. Una volta sintetizzati il primo e il secondo filamento del cDNA, si esegue una trascrizione ad opera della polimerasi T7, che avvia così un processo di amplificazione lineare a cRNA con incorporazione simultanea di citosina coniugata a Cy3 presente nel mix di nucleotidi forniti per la trascrizione in vitro.

Insieme all'RNA campione vengono amplificati e marcati i "One-Color Spike-In" mix trascritti e disegnati per ibridare specificatamente con sonde di controllo del microarray. Questi controlli consentono di valutare linearità, accuratezza e sensibilità valutando il

ratio, ovvero la presenza o meno di modulazione di un dato gene.

In dettaglio, a 1 µg di RNA totale, viene addizionato il *T7 promoter primer* e uno specifico *Spike-In* e si denatura 10 minuti a 65 °C per eliminare le strutture secondarie. Dopo aver bloccato la reazione in ghiaccio per 5 minuti, sono aggiunti a ciascun campione 8,5 µl di cDNA Master Mix contenente 5X *first strand buffer*, DTT 0,1 M come agente riducente, dNTP mix, MMLV-RT ed RNase OUT, di cui quest'ultimo per l'inibizione competitiva delle RNasi. La retrotrascrizione si realizza incubando a 40°C per 2 ore.

I campioni sono quindi trasferiti a 65°C per inattivare la MMLV-RT e, dopo aver bloccato la reazione in ghiaccio, si procede alla trascrizione del cDNA, formatosi nel passaggio precedente, ad opera della T7 RNA polimerasi. A tale scopo viene addizionata la *Transcription Master Mix* contenente anche Cy3-CTP, preparata secondo il protocollo fornito dal kit Agilent e contenente 4X *Transcription Buffer*, DTT 0,1 M, NTP mix, polietilenglicole (PEG), *RNaseOUT*, fosfato inorganico ed RNA polimerasi T7.

Per la sintesi del cRNA fluorescente i campioni vengono incubati a 40°C per 2 ore al buio.

Il cRNA viene poi purificato mediante sistema *RNesay mini kit* (Quiagen), operando in condizioni *RNasi free*, per eliminare eventuali tracce di nucleotidi marcati non incorporati, che al momento dell'ibridazione potrebbero innalzare il background di fluorescenza dell'*array*.

Si procede poi alla quantificazione spettrofotometrica al NanoDrop del campione, valutando anche l'efficienza di incorporazione della cianina. Questo è reso possibile da una lettura alla lunghezza d'onda di 260 nm, per ottenere la concentrazione di RNA, abbinata al valore di assorbanza a 550 nm indicativo della presenza di Cy3. Si valuta l'efficienza di incorporazione calcolando la quantità di cianina per µg di RNA con le seguenti formule:

$$\frac{(\text{Concentrazione di cRNA}) * 30 \mu\text{L (volume di eluizione)}}{1000} = \mu\text{g di cRNA}$$

$$\frac{(\text{Concentrazione di Cy3})}{(\text{Concentrazione di cRNA})} * 1000 = \text{pmol Cy3 per } \mu\text{g cRNA}$$

Se i µg di cRNA sono < di 1.65 e le pmol di Cy3 per µg di cRNA sono < di 9.0 è necessario ripetere la preparazione del cRNA.

Ibridazione e lavaggi

Gli oligo microarray vengono ibridati con cRNA frammentato tramite digestione chimica, in modo da rendere ottimali le condizioni di appaiamento evitando la formazione di strutture secondarie. A tale scopo si procede alla preparazione di una *cRNA target solution* in acqua *RNase free* contenente i cRNA e l'agente

bloccante. Si aggiunge quindi il *Fragmentation Buffer*, incluso nel kit, e si incuba a 60°C per 30 minuti.

Al termine della frammentazione si aggiunge l'*Hybridization Buffer* e si procede al caricamento del campione sul vetrino che poi viene assemblato nella camera da ibridazione. Le camerette vengono sistemate nel *rack* rotante del forno da ibridazione e si ibrida a 4 rpm per 17 ore alla temperatura di 60°C.

La camera da ibridazione viene poi smontata e il vetrino viene lavato nella soluzione di lavaggio 1 (SSPE 6X e N-lauroilsarcosina 0,05%) poi nella soluzione di lavaggio 2 (SSPE 0,06X, N-lauroilsarcosina 0,05%) per un minuto in agitazione. Il vetrino si asciuga sollevandolo lentamente dal *rack* portavetrino. Si trasferisce immediatamente nell'apposito *slide holder*, da sistemare nel carosello dello *scanner* Agilent per la successiva lettura.

Scansione delle slide

Per la lettura del *microarray* si è utilizzato il sistema Agilent *Microarray Scanner* che utilizza il laser SHG-YAG (532 nm) per eccitare il fluorocromo Cy3 e misurarne l'intensità di fluorescenza. Sono stati utilizzati vetrini Agilent *Whole Mouse 1 Oligo Microarray*.

Ogni *array* comprende 44000 oligonucleotidi. L'immagine scansionata viene analizzata mediante il *software* di

Feature Extraction 9.5.1 in dotazione allo scanner Agilent. Il programma opera la localizzazione di tutti gli *spot* sull'array (*Find Spot Algorithm*), la definizione della *feature* e del *local background* per ciascuno *spot* (*Cookie Cutter Algorithm*), provvedendo poi allo scarto dei *pixel outlier*, con intensità troppo alta o troppo bassa rispetto a una statistica di popolazione dell'intero array.

Per l'analisi dei dati ottenuti si utilizza un *software* dedicato, *GeneSpring GX*.

GeneSpring GX fornisce strumenti statistici potenti ed accessibili per una veloce visualizzazione ed analisi dei dati di espressione genica. Il *software* consente di utilizzare un *desktop* interattivo che promuove l'indagine e la comprensione dei dati di *microarray* all'interno di un contesto biologico.

GeneSpring GX permette di individuare in modo rapido e affidabile gli obiettivi di interesse sia da un punto di vista biologico che statisticamente significativo. Sviluppato da *Avadis™* (*Strand Life Sciences*), *GeneSpring GX* è parte della piattaforma fornita da Agilent per i sistemi di ricerca.

Risultati

Test di citotossicità e di trasformazione

Come approccio preliminare alla valutazione della citotossicità indotta da miscele di PCB, è stato valutato su cellule BALB/c 3T3 l'effetto di un ampio range di dosi di A1260 (0.05 ppm - 2 ppm, veicolato in esano c.f. 0.2%) sull'efficienza clonale. Il test è stato condotto parallelamente utilizzando terreno completo (DMEM più NCS 10%) o terreno addizionato al 10% di siero inattivato con il calore (56°C per 35 minuti), per valutare se effettivamente, come riportato in letteratura su altre linee cellulari (Hestermann et al. 2000, Lee 2001), la risposta all'azione dei PCB poteva essere influenzata dalle proteine del siero.

Dopo l'esposizione di cellule BALB/c 3T3 al composto in esame per 48 ore si evidenzia una variazione nella risposta delle cellule cresciute in condizioni differenti. Quando le cellule 3T3 vengono esposte all'A1260 in terreno con siero parzialmente privato della componente proteica, la risposta al composto appare dose-dipendente, fig. 1.

Risulta plausibile che le proteine del siero completo possano aver sequestrato le molecole di A1260 andando in questo modo ad influire sulla risposta cellulare, come si nota dal grafico di fig. 2.

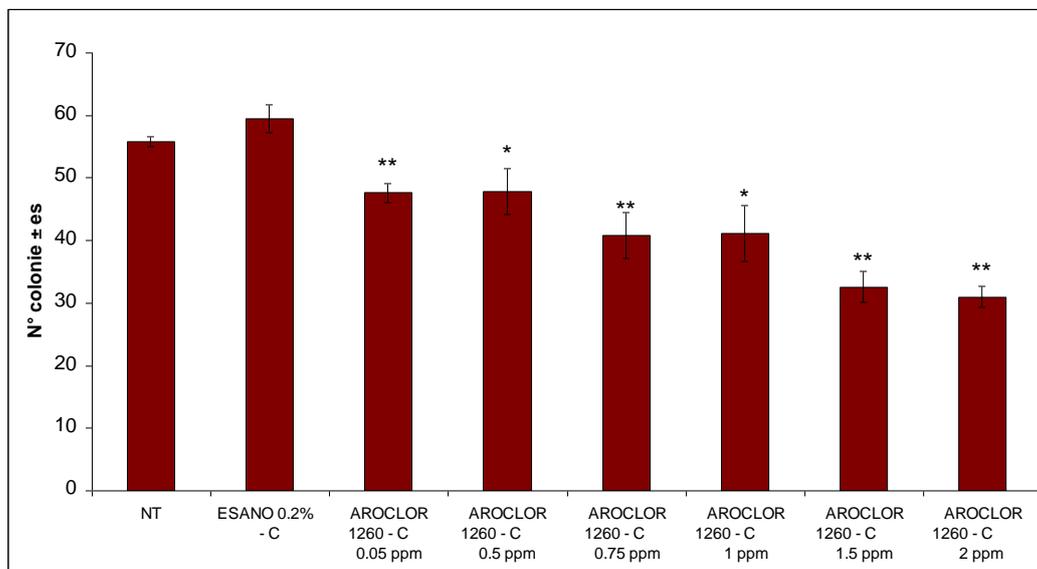


Fig. 1 Numero medio di colonie di cellule BALB/c 3T3 trattata con A1260 e coltivate in terreno addizionato con siero parzialmente de-proteinizzato (è stato eseguito il test T, trattato vs solvente, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa $p < 0.01$).

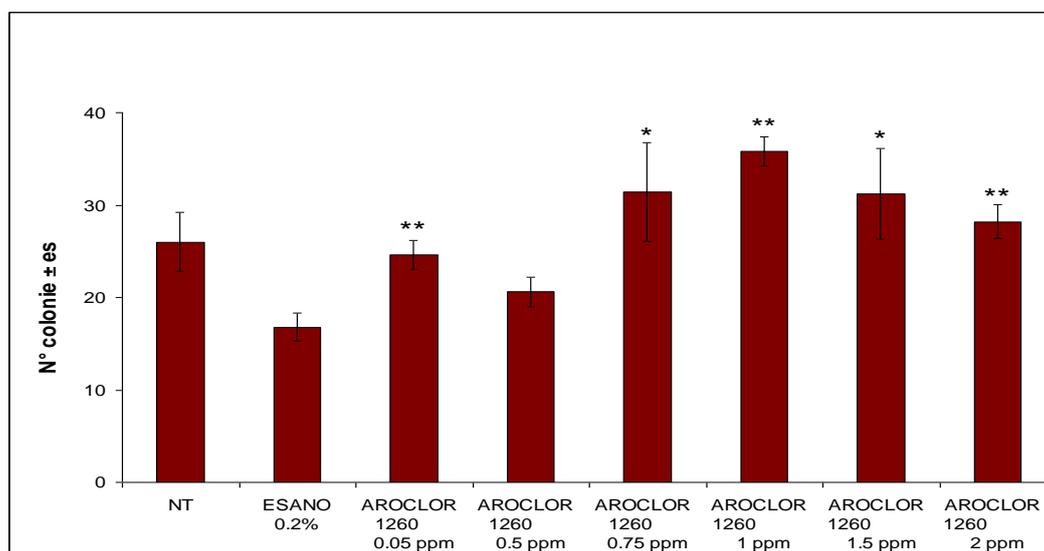


Fig. 2 Numero medio di colonie di fibroblasti murini BALB/c 3T3 messi in coltura con terreno e siero completo e trattati con A1260 (è stato eseguito il test T, trattato vs solvente, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa $p < 0.01$).

Successivamente si è voluta valutare l'attività trasformante dell'Aroclor 1260 attraverso il test di trasformazione in vitro su cellule BALB/c 3T3.

Nel test di trasformazione che è stato allestito, insieme ad un test di citotossicità condotto in parallelo, oltre al controllo positivo classico (3-MCA) e al relativo solvente (DMSO) è stato effettuato, anche un controllo in esano, il solvente per l'Aroclor 1260.

Le dosi di trattamento con A1260 (0.5, 1 e 2 ppm), sono state scelte alla luce dei risultati del test di citotossicità preliminare come le più rappresentative.

I risultati sono rappresentati in fig. 3 e 4.

Per quanto riguarda il test di citotossicità condotto parallelamente al test di trasformazione (fig. 3), i risultati mostrano come in seguito al trattamento con i due solventi, DMSO ed esano, usati come controllo negativo, non si riscontrano una diminuzione del numero medio di colonie/piastra, mentre il cancerogeno noto, 3-MCA, determina una riduzione di circa il 10% dell'efficienza clonale. In merito alla risposta della linea BALB/c 3T3 al trattamento con A1260 è possibile evidenziare una lieve diminuzione dell'efficienza clonale che non sembra correlata alla dose di utilizzo.

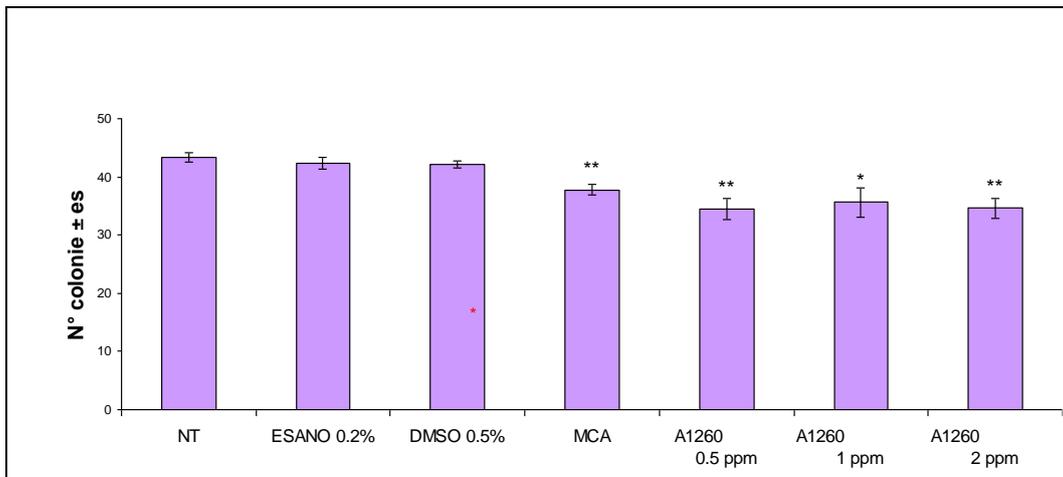


Fig. 3 Numero medio di colonie di fibroblasti murini BALB/c 3T3 dopo trattamento con A1260 (è stato eseguito il test T, trattato vs solvente, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa $p < 0.01$).

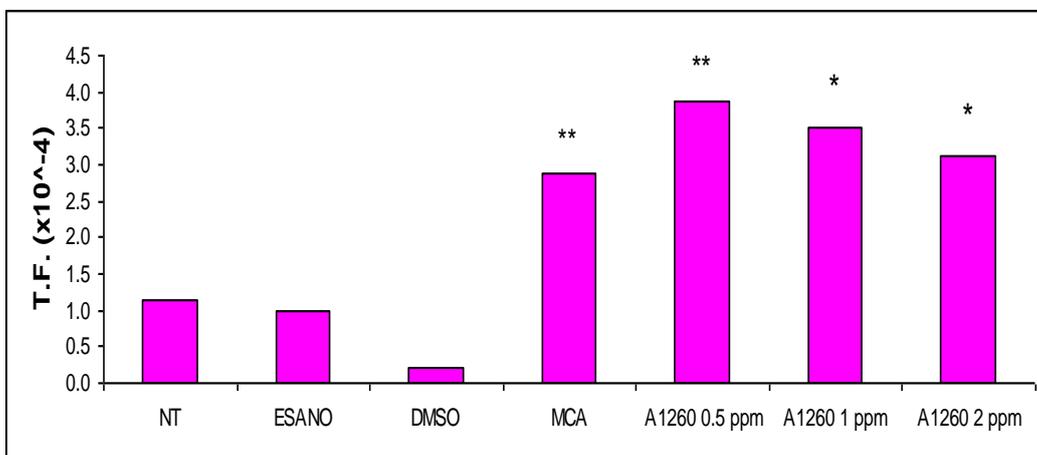


Fig. 4 Trasformazione indotta da A1260 in cellule BALB/c 3T3 (è stato eseguito il test di Poisson, trattato vs solvente: * differenza significativa $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa $p < 0.01$).

In figura 4 risulta evidente un aumento significativo della frequenza di trasformazione delle piastre trattate con la miscela di PCB in esame rispetto sia alle piastre non trattate che alle piastre in cui sono stati valutati i due solventi.

Nel corso del lavoro, si è deciso di cambiare il solvente utilizzato passando al DMSO, andando a valutare nuovamente sia la capacità citotossica che quella trasformante di A1260.

Contemporaneamente si è deciso di valutare gli effetti di un MIX di 18 congeneri di PCB scelti seguendo le linee guida dell'Istituto Superiore di Sanità (2001). Cellule BALB/c 3T3 sono state trattate con un range di concentrazioni compreso tra 0.5 e 20 μM di A1260 o MIX di PCB per valutare l'attività citotossica e trasformante delle due miscele (fig. 5-8).

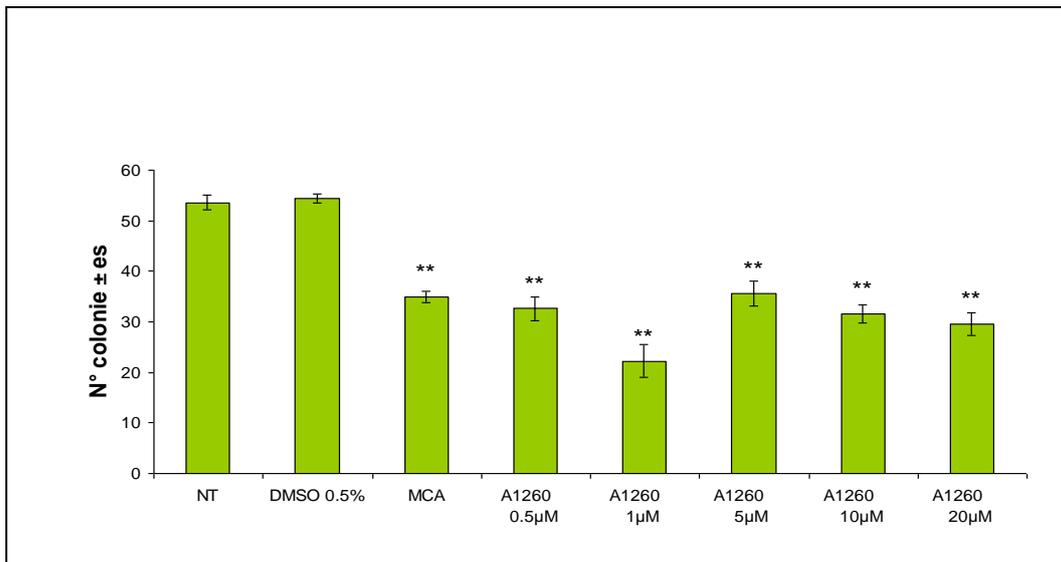


Fig. 5 Effetto citotossico di A1260 in fibroblasti murini BALB/c 3T3 (è stato eseguito il test T, trattato vs solvente, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa, $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa, $p < 0.01$).

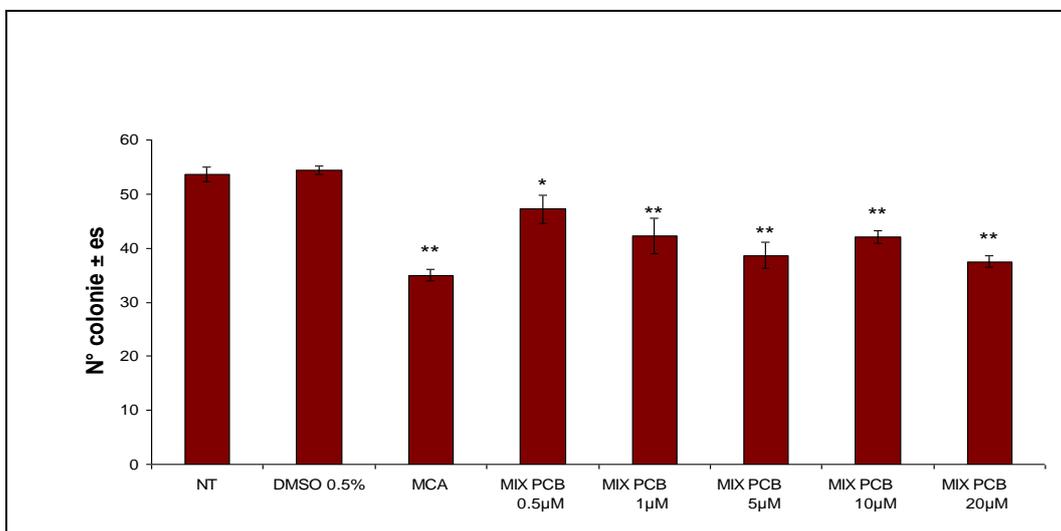


Fig. 6 Effetto citotossico del MIX di PCB in fibroblasti murini BALB/c 3T3 (è stato eseguito il test T, trattato vs solvente, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa, $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa, $p < 0.01$).

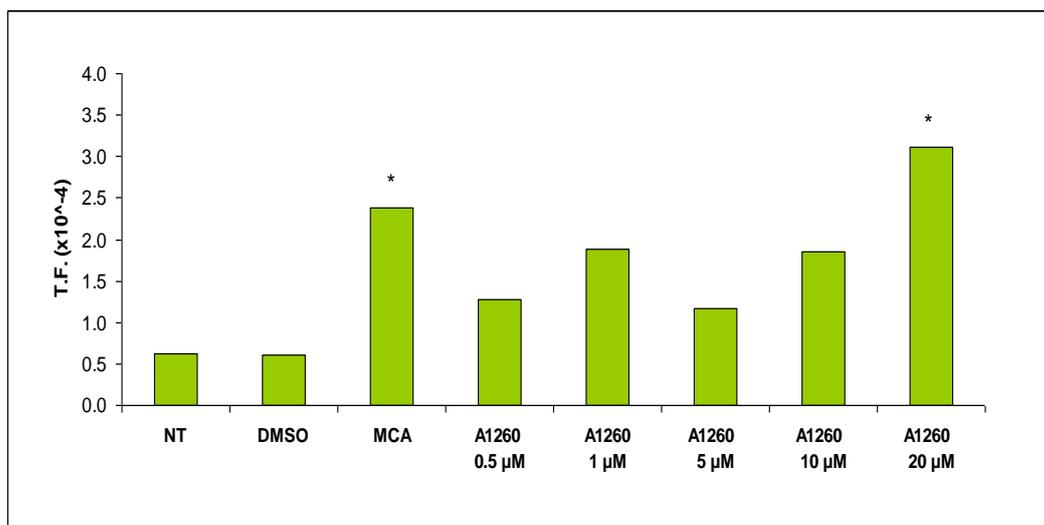


Fig. 7 Effetti trasformanti di A1260 su fibroblasti murini BALB/c 3T3 (test di Poisson, trattato vs solvente: * differenza significativa, $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa, $p < 0.01$).

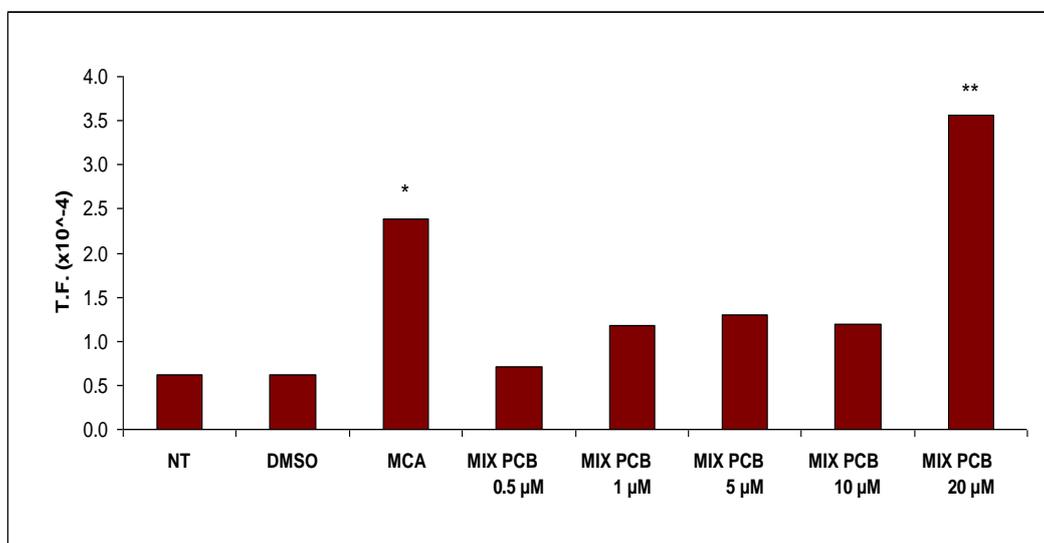


Fig. 8 Effetti trasformanti del MIX di PCB su fibroblasti murini BALB/c 3T3 (test di Poisson, trattato vs solvente: * differenza significativa, $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa, $p < 0.01$).

Come si evince dai grafici 5 e 6, dopo 48 h di esposizione di cellule BALB/c 3T3 ai composti in esame si evidenzia un effetto citotossico significativo sia della miscela di A1260 che del MIX dei 18 congeneri. Per quanto riguarda invece la capacità trasformante un aumento significativo della frequenza di trasformazione è evidente solo alla dose più alta utilizzata (20 µM) per entrambe le miscele.

Test di vitalità

Il lavoro è proseguito con l'allestimento di test di vitalità al fine di valutare gli effetti a breve termine dei PCB sulla proliferazione cellulare.

Oltre alla linea cellulare di fibroblasti murini BALB/c 3T3, è stata esaminata la risposta ad A1260 di linee cellulari di carcinoma mammario, MCF7 e T47D.

Inizialmente si è partiti con la valutazione degli effetti dell'A1260 veicolato in esano.

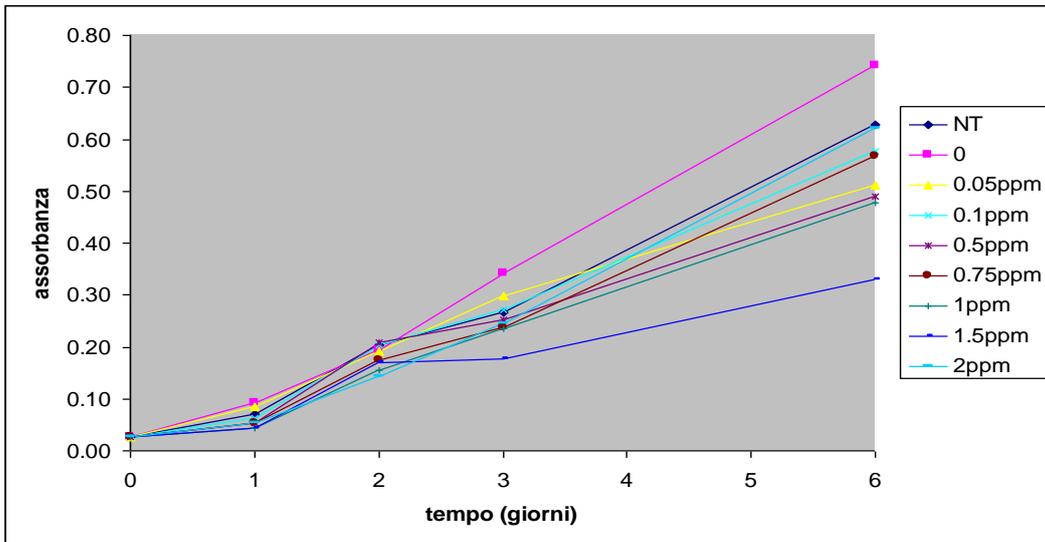


Fig 9 Effetto dell'Al260 in esano sulla crescita di cellule Balb/c 3T3.

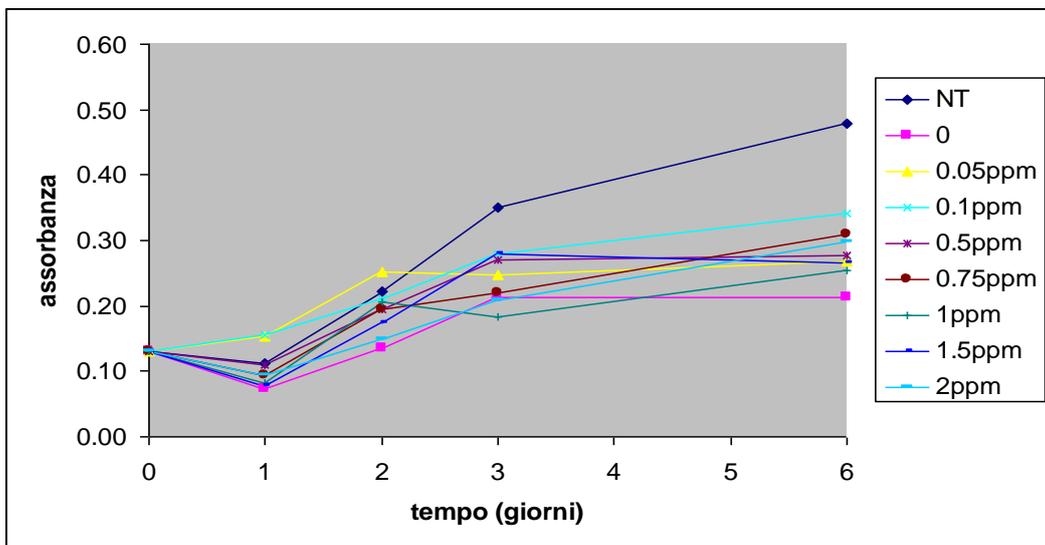


Fig. 10 Effetto dell'Al260 in esano sulla crescita di cellule MCF7.

Le linee cellulari esaminate non hanno risposto al trattamento; probabilmente, anche in questi casi, entrano in gioco problemi di veicolazione del composto. L'utilizzo dell'esano come solvente risulta limitante in quanto la massima concentrazione utilizzabile, per gli effetti tossici indotti dal solvente stesso, è di 2 ppm (corrispondenti a circa 6 μM).

Si è deciso di allestire dei test di vitalità con la linea cellulare MCF7 utilizzando A1260 sciolto in DMSO, con il quale è possibile raggiungere concentrazioni più alte. E' stato preso in esame un intervallo di concentrazioni dei composti molto ampio (0.001-100 μM). Il risultato è mostrato in figura 11.

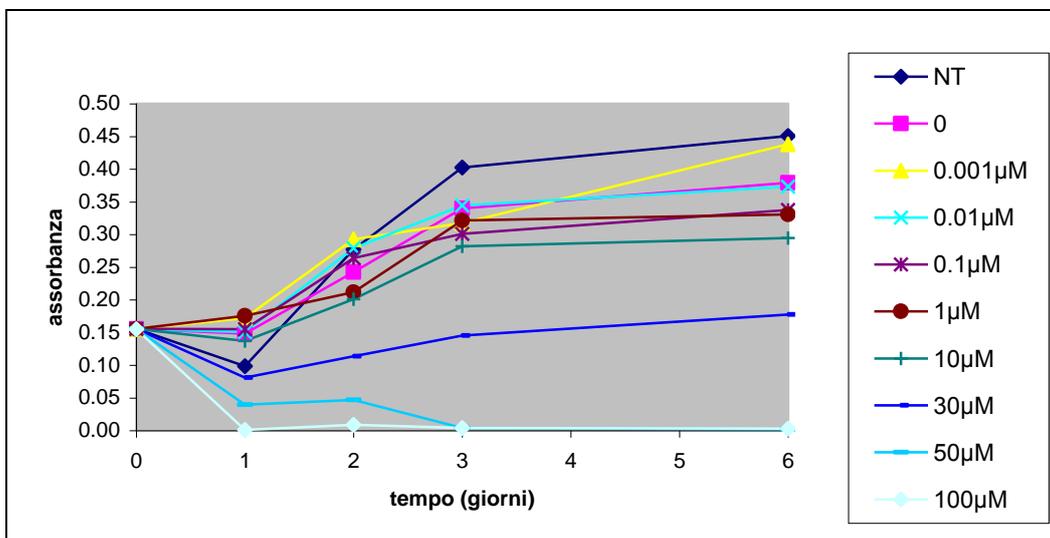


Fig. 11 Effetto dell'A1260 in DMSO sulla crescita di cellule MCF7.

Risulta evidente un aumento della tossicità del composto proporzionale alla dose, in particolar modo

per le concentrazioni più elevate, dai 10 μM ai 100 μM ; alle dosi più basse manca una corrispondenza diretta. L'effetto citotossico dell' A1260 è già riscontrabile dopo 24 ore di esposizione.

Si è poi passati alla linea cellulare T47D. Tale linea cellulare è stata scelta, in rapporto alle sue caratteristiche recettoriali, per le analisi successive dell'attività estrogenica ed antiestrogenica sia dell'A1260 che del MIX dei 18 PCB che dei congeneri singoli.

I risultati hanno costituito la base per proseguire con le successive analisi.

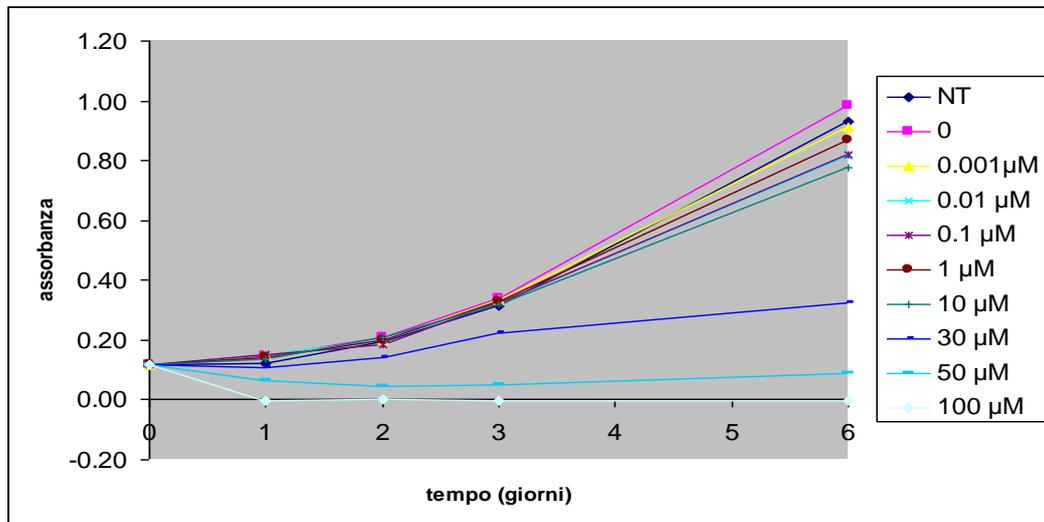


Fig. 12 Effetto dell'A1260 in DMSO sulla crescita di cellule T47D.

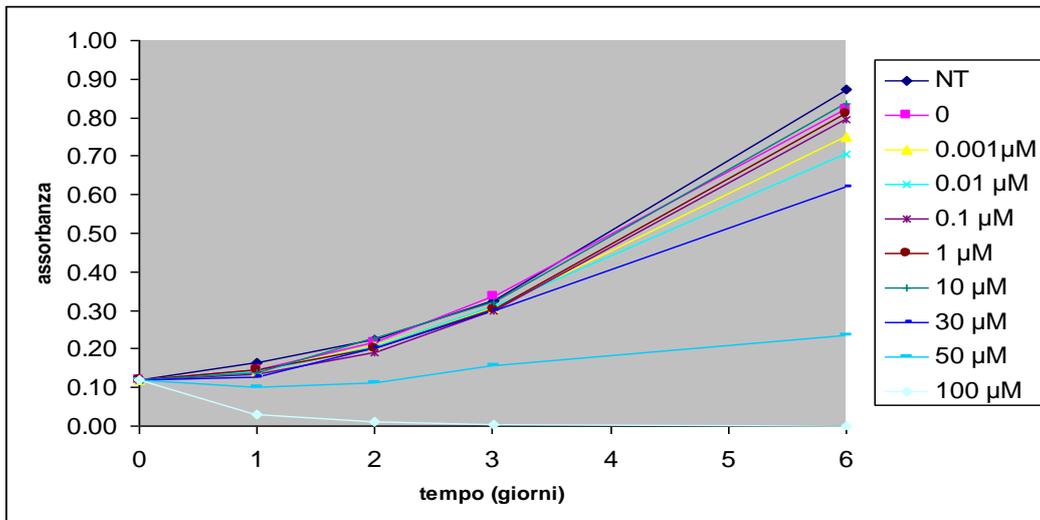


Fig. 13 Effetto del MIX di PCB in DMSO sulla crescita di cellule T47D.

E' riscontrabile (fig. 12 e 13) un aumento della tossicità del composto dose-dipendente, in particolar modo dopo trattamento con le concentrazioni più elevate, dai 30 μM ai 100 μM ; alle dosi più basse manca una relazione analoga. L'effetto dell'A1260 sulla riduzione della crescita cellulare è rilevante già a dosi di 30 μM .

Successivamente si è andato a valutare l'effetto sulla proliferazione cellulare di due PCB singoli scelti tra quelli che andavano a costituire il MIX dei 18.

Sono stati scelti i congeneri PCB 118, Dioxin-Like, e il PCB 153, Non Dioxin-Like. Tale scelta è stata fatta per valutare una possibile differenza di risposta tra le due classi di congeneri in funzione di studi successivi ed inoltre perché questi congeneri sono stati oggetto di studi recenti da parte del *National Toxicology Program* (NTP maggio 2006 e novembre 2006).

I risultati sono rappresentati in fig. 14 e 15.

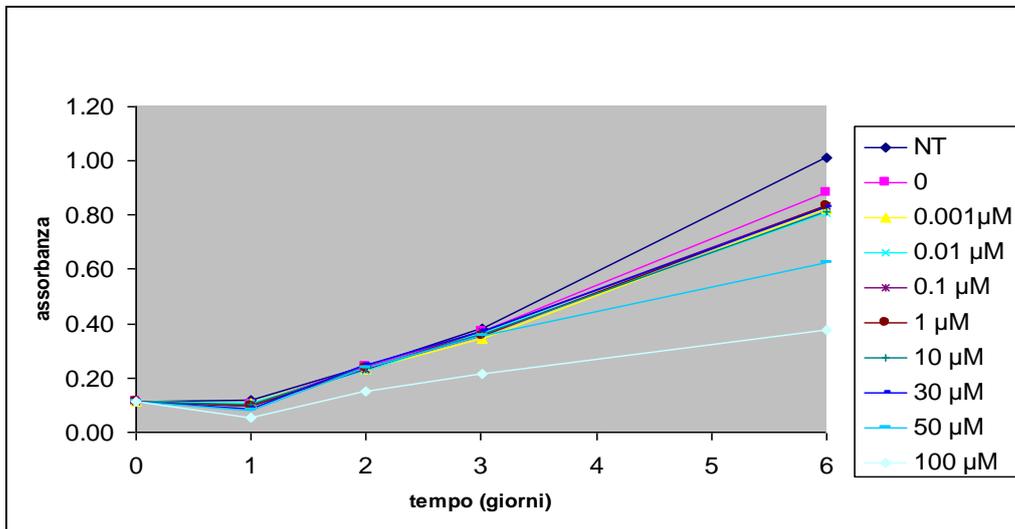


Fig. 14 Effetto del PCB 118 sulla crescita di cellule T47D.

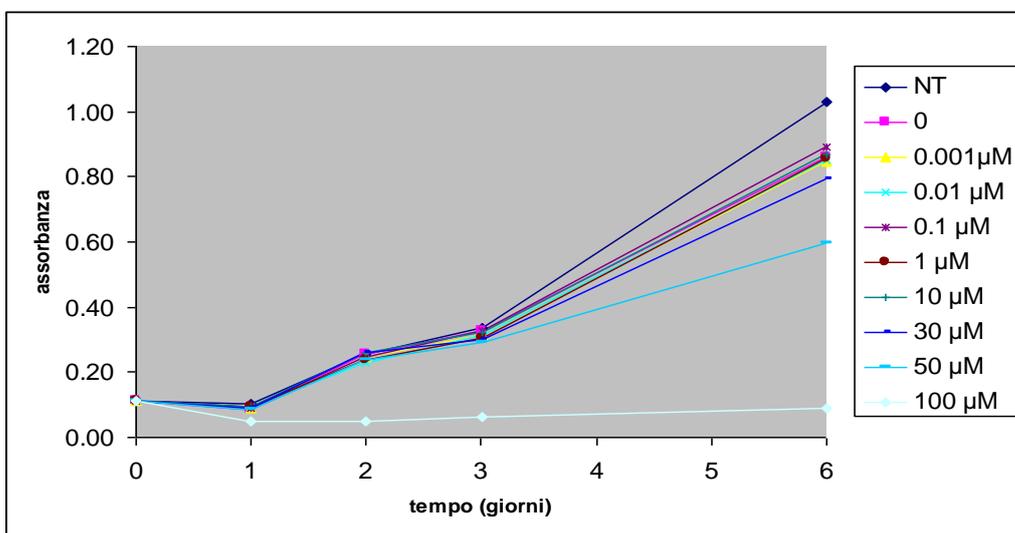


Fig. 15 Effetto del PCB 153 sulla crescita di cellule T47D.

Il PCB 153 ha una tossicità maggiore alla dose di 100 μM rispetto al PCB 118, mentre gli effetti alla dose di 50 μM sono analoghi, le risposte alle dosi più basse non sembrano avere un andamento correlato alla dose stessa.

Saggio di E-screen

Inizialmente il saggio di E-screen è stato condotto in maniera analoga al test di vitalità, tuttavia con l'accorgimento di utilizzare del siero "strippato", in cui viene eliminata la componente estrogenica, e di utilizzare un'unica dose di 17β -estradiolo (10nM) come controllo positivo, promotore della crescita in cellule ER+. Questo saggio permette infatti di valutare i possibili effetti estrogenici delle molecole in esame. Come primo approccio è stata utilizzata la linea cellulare MCF7, che esprime i recettori per gli estrogeni ed è quindi in grado di rispondere allo stimolo estrogenico con un incremento del rate proliferativo, valutando la risposta di tale linea all'A1260 in DMSO (fig. 16).

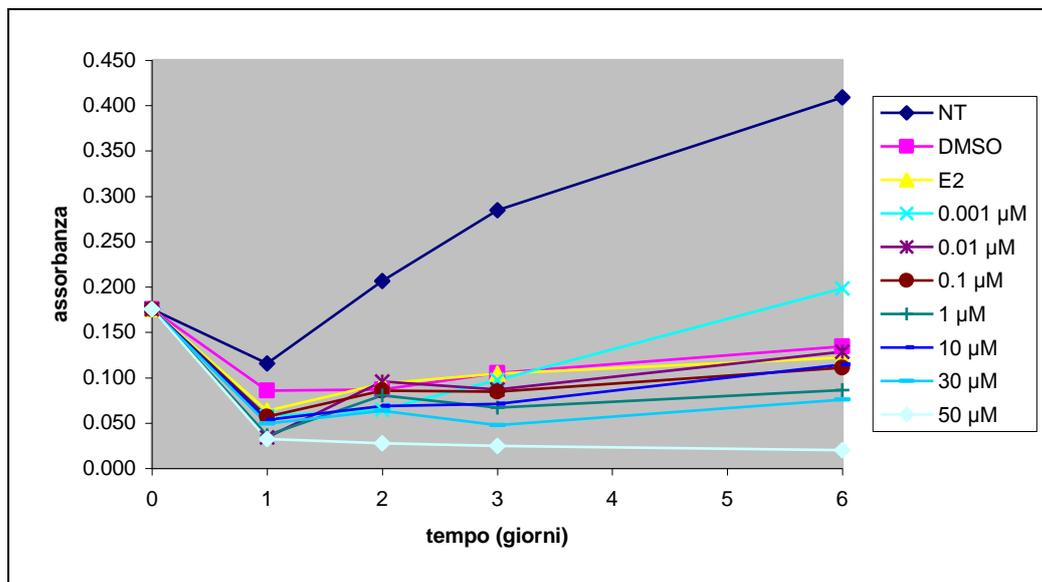


Fig. 16 Valutazione di possibili effetti estrogenici dell'A1260 sulla linea cellulare MCF7

La risposta delle cellule al trattamento non è risultata ottimale.

Le cellule non hanno risposto all'azione dell'estradiolo e la tossicità alle diverse dosi non sembra essere dose-relata.

In relazione a quanto riportato in letteratura (Soto et al. 1995, Soto et al. 2004) si è deciso di modificare il protocollo di E-screen e di utilizzare per il saggio la linea cellulare T47D.

Le cellule cresciute in terreno privo di stimoli estrogenici, sono state trattate con E2 (0.05 pM-10 nM) per valutare la capacità di risposta all'estrogeno e costruire una curva di riferimento.

Come atteso, la risposta all'estrogeno ha determinato un incremento decisivo della crescita dose-relato (fig. 17).

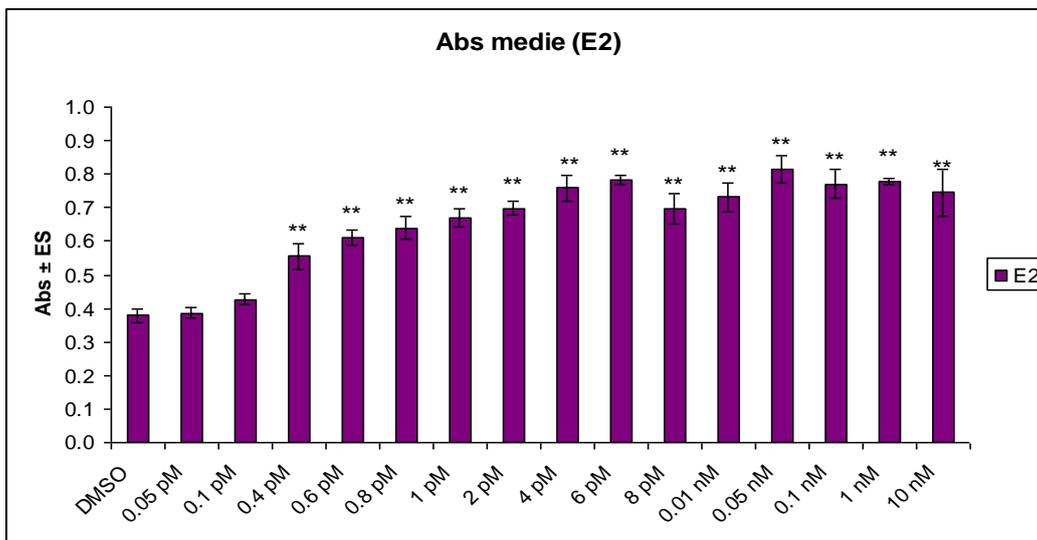


Fig. 17 Saggio di E-screen per il 17 β -estradiolo (è stato eseguito il test T, trattato vs solvente, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa, $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa, $p < 0.01$).

Il test è stato allestito in modo tale da poter contemporaneamente valutare possibili effetti estrogenici ed anti-estrogenici sia dell'A1260 che del MIX dei 18 congeneri e dei due congeneri singoli.

I composti sono stati saggiati in un range di dosi tra 0.5 e 25 μM , da soli o insieme a 17 β -estradiolo alla concentrazione che induce una risposta proliferativa massimale (0.05 nM) (fig. 18 e 19).

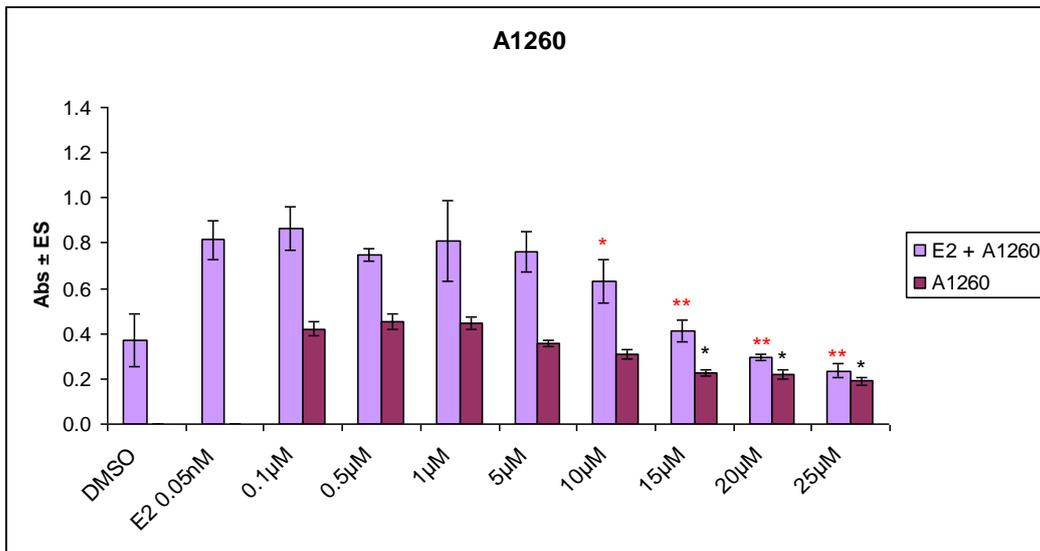


Fig. 18 Saggio di E-screen per A1260 (è stato eseguito il test T, trattato vs E2, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa, $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa, $p < 0.01$; trattato vs solvente, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa, $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa, $p < 0.01$).

L'A1260 non risulta avere effetti estrogenici sulla linea cellulare T47D; non si sono osservati, infatti, incrementi significativi della crescita. Al contrario, alle dosi più elevate, si osserva una diminuzione della crescita, dovuta probabilmente all'effetto tossico della miscela di PCB.

La somministrazione contemporanea di E2 (0.05nM) e A1260 non ha prodotto effetti significativi sulla proliferazione cellulare. Anche in questo caso si osserva un decremento alle dosi più elevate probabilmente legato all'inibizione della crescita cellulare da parte di A1260.

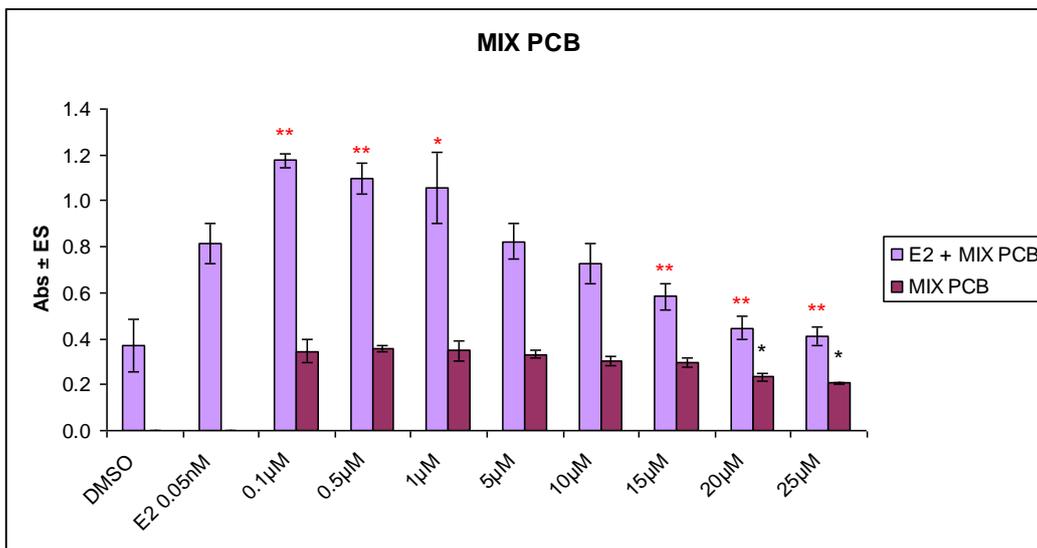


Fig. 19 Saggio di E-screen per il MIX dei 18 congeneri (è stato eseguito il test T, trattato vs E2, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa, $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa, $p < 0.01$; trattato vs solvente, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa, $p < 0.01$).

La somministrazione del MIX di PCB sulla stessa linea cellulare, T47D, non determina un aumento della crescita cellulare, per cui la miscela non sembra avere effetti estrogenici.

La somministrazione contemporanea delle diverse dosi di MIX e di E2 0.05 nM induce, alle dosi più basse, un incremento significativo rispetto a quanto osservato per l'E2 da solo.

Alle dosi più elevate, anche in questo caso, si manifesta un effetto tossico della miscela.

L'analisi della letteratura ha permesso l'individuazione di una serie di indici per l'elaborazione dati dei risultati di E-screen.

In tale elaborazione viene valutato l'effetto proliferativo (PE) del composto in esame dato dal rapporto tra il valore massimo di assorbanza del trattato ed il valore di assorbanza del relativo solvente (Soto et al. 1995).

In base a questo si è elaborato un grafico, fig. 20, che ci permette di avere un quadro generale chiaro delle diverse risposte cellulari ai composti utilizzati, da soli o in associazione con l'E2.

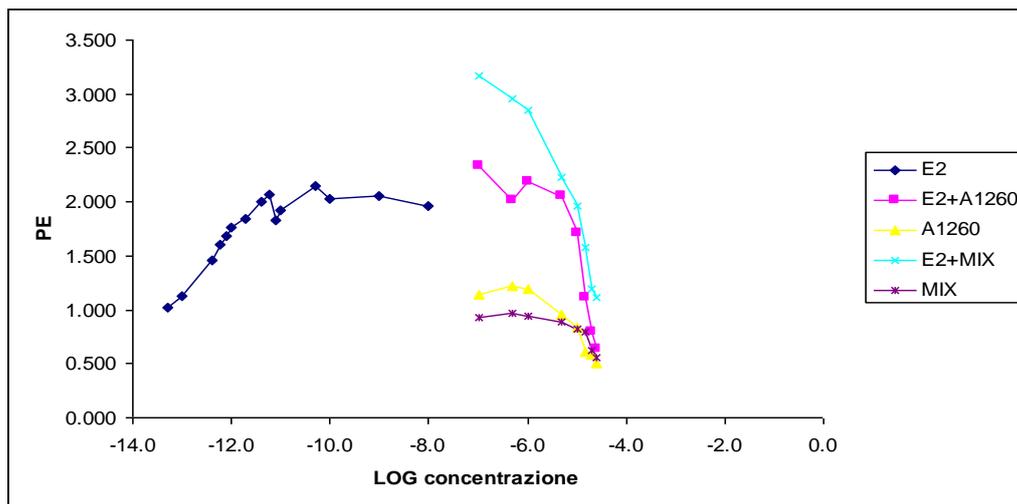


Fig. 20 Log della concentrazione in rapporto al PE.

Nelle stesse condizioni sperimentali è stato anche valutato il possibile effetto estrogenico ed antiestrogenico dei due PCB singoli (fig. 21 e 22).

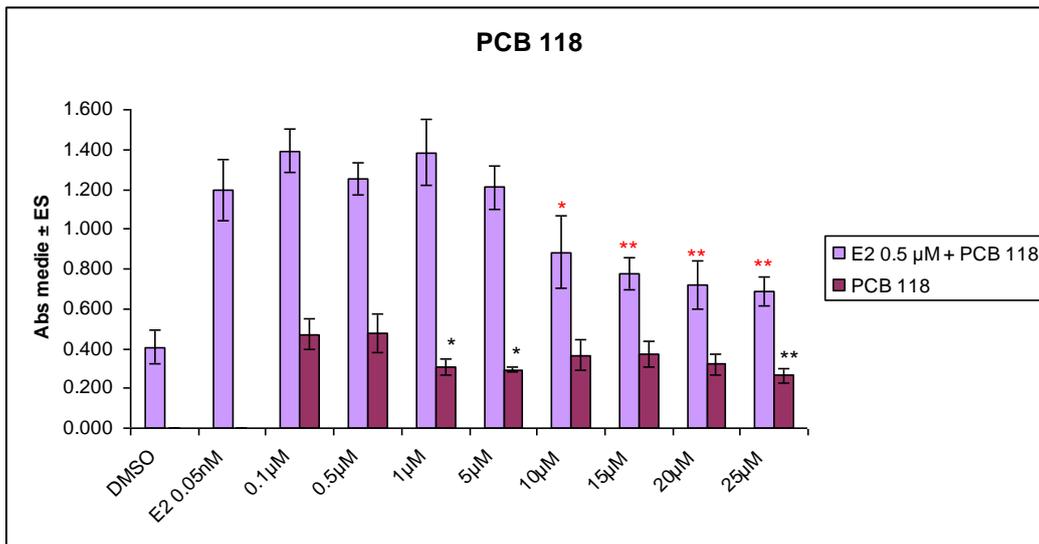


Fig. 21 Saggio di E-screen per il PCB 118 (è stato eseguito il test T, trattato vs E2, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa, $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa, $p < 0.01$; trattato vs solvente, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa, $p < 0.01$).

Il PCB 118 non presenta effetti estrogenici sulla linea cellulare T47D; non si sono verificati incrementi significativi della crescita indotti da tale molecola. Alle dosi più elevate si è, invece, osservata una diminuzione della crescita, dovuta probabilmente al suo effetto tossico.

La somministrazione contemporanea di E2 (0.05nM) e PCB 118 non ha prodotto effetti significativi, mentre si osserva un decremento della crescita cellulare alle dosi più elevate.

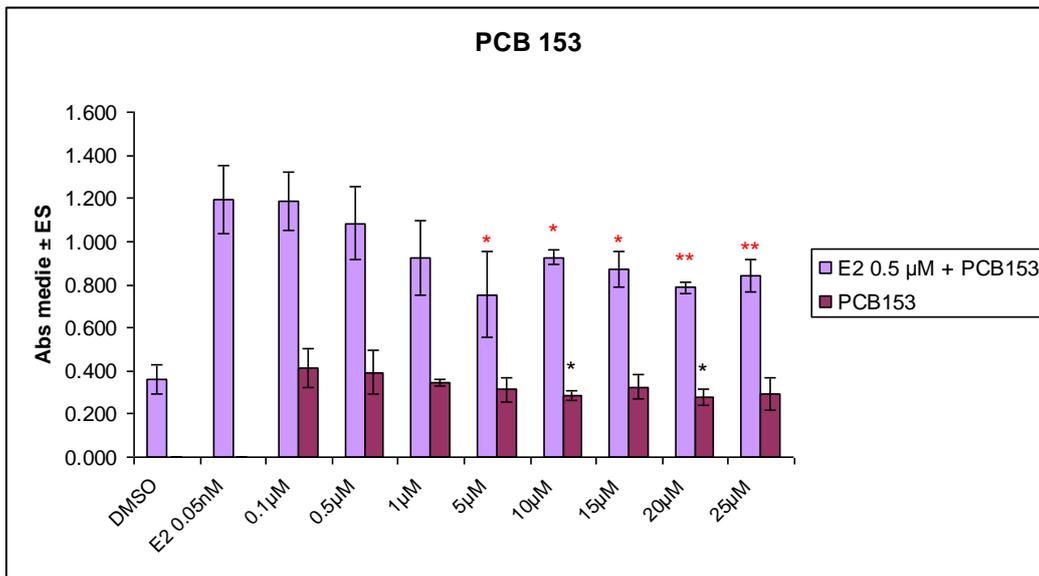


Fig. 22 Saggio di E-screen per il PCB 153 (è stato eseguito il test T, trattato vs E2, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa, $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa, $p < 0.01$; trattato vs solvente, per l'elaborazione statistica dei dati: * differenza significativa $p < 0.05$; ** differenza altamente significativa, $p < 0.01$).

Anche il PCB 153 presenta un andamento analogo al PCB 118, per cui non sembra ci siano effetti estrogenici della molecola quando somministrata da sola, in concomitanza con il 17β -estradiolo non emergono effetti sinergici o antiestrogenici, mentre viene confermato l'effetto tossico alle dosi più elevate.

Anche per i due PCB singoli è stata elaborata una curva utilizzando il valore di PE in rapporto al Log della concentrazione (fig. 23).

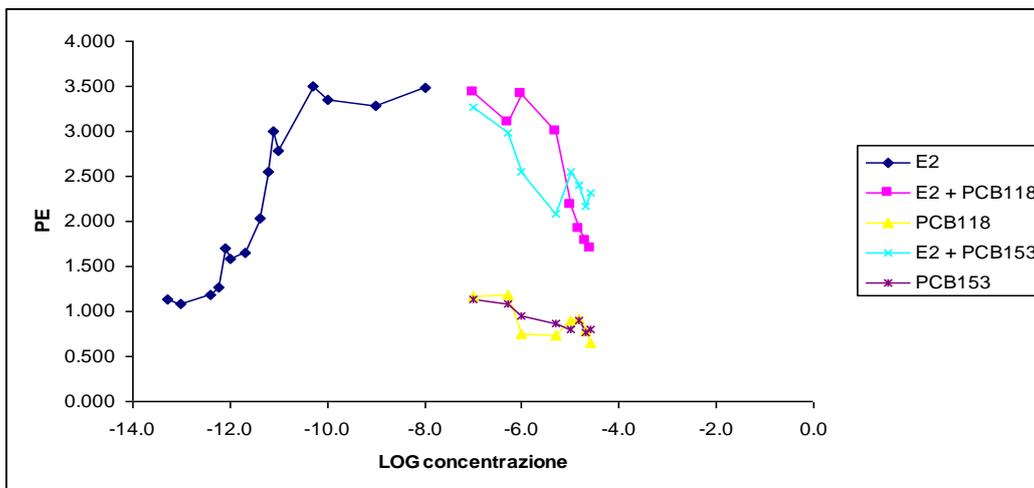


Fig. 23 Log della concentrazione dei composti in rapporto al PE.

Real-Time PCR

La linea cellulare T47D è stata mantenuta come target per via del particolare assetto recettoriale che la rende strumento idoneo a valutare differenti *endpoint* funzionali legati all'interferenza endocrina e ad individuare gli effetti sull'espressione genica di molecole ad attività estrogenica e/o diossino-simile. Si è scelto di valutare l'espressione genica di PDZK, modulato positivamente dal trattamento con 17- β estradiolo (Wang et al. 2004), e di CYP1A1, marcatore della via di segnalazione del recettore arilico (AhR) (Spink et al. 1998).

Il lavoro è quindi proseguito valutando la modulazione dei due geni selezionati a seguito di trattamento con E2 (10 nM), PCB 118 (25 μ M) e MIX dei 18 congeneri (25 μ M) per 4 e 16 ore dopo aver mantenuto le cellule in

coltura per due giorni in terreno completo (fig. 24 e 25).

I tempi di trattamento, in un primo tempo, sono stati scelti in base a quanto suggerito dalla letteratura (Wang et al. 2004).

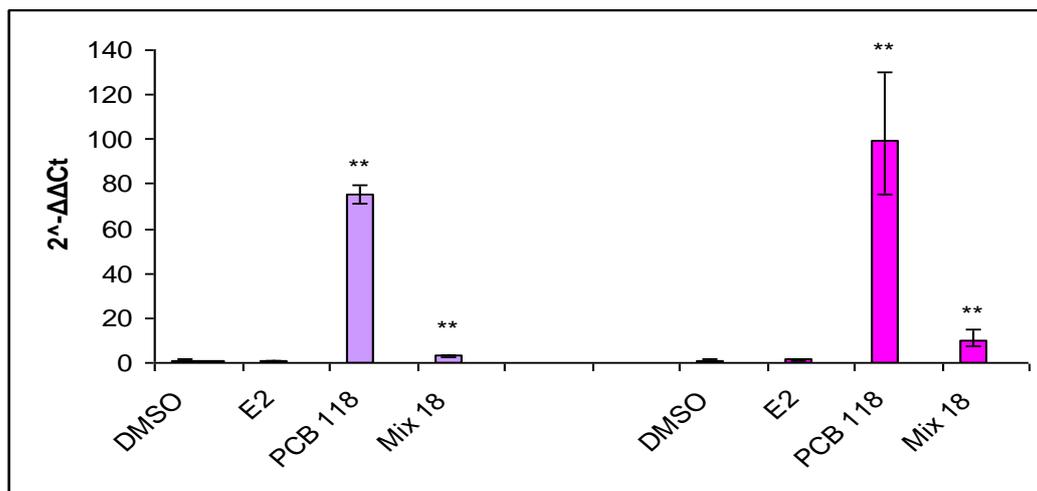


Fig.24 Modulazione del gene CYP1A1. Trattamenti di 4 e 16 ore. ** $P < 0.01$, differenza altamente significativa rispetto al DMSO valutata mediante Test T.

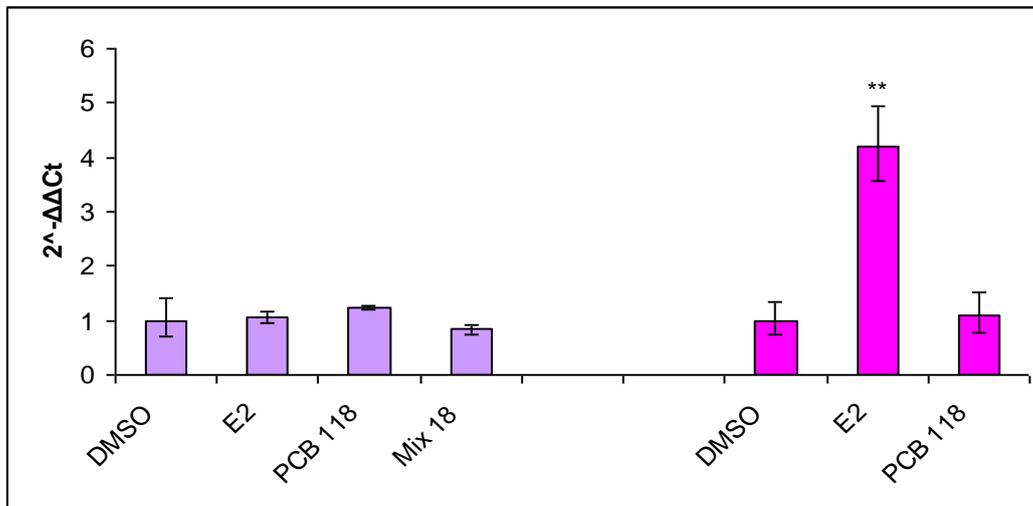


Fig.25 Modulazione del gene PDZK. Trattamenti di 4 e 16 ore. ** P< 0.01, differenza altamente significativa rispetto al DMSO valutata mediante Test T.

Come si osserva in figura 24, vi è una stimolazione altamente significativa del gene CYP1A1 dopo trattamento di 4 e 16 h con il singolo congenere dioxin-like o con il MIX equimolare dei 18 alla dose di 25 µM. Tale dose, che corrisponde al valore di GI50 relativo al MIX dei 18 PCB calcolato mediante saggio di vitalità, già dopo 4 ore induce l'espressione di CYP1A1 di 70 volte rispetto al non trattato, mentre dopo 16h questo incremento sale addirittura fino a circa 100 volte. La minore entità della risposta in seguito a trattamento con il MIX di PCB, sempre comunque statisticamente significativa, sembra rispecchiare le proporzioni relative di congeneri dioxin-like all'interno della miscela.

Per quanto riguarda il gene PDZK (fig. 25), l'attivazione trascrizionale da parte di E₂ 10 nM (4 o 16 h di trattamento) risulta statisticamente

significativa e sperimentalmente ripetibile solo alle 16 h di trattamento. Non è riscontrabile nessun effetto di stimolazione del *pathway* degli estrogeni da parte di PCB 118, a conferma del risultato del test funzionale. Per poter evidenziare risposte trascrizionali a tempi più brevi e più consoni alle future analisi di modulazione dell'espressione genica, l'attenzione si è focalizzata sulla valutazione di eventuali interferenze degli estrogeni presenti nel terreno di coltura. Per questo motivo cellule T47D sono state mantenute in condizioni di coltura diversificate e successivamente esposte per 4 ore ad un trattamento con estradiolo 1 nM; l'eliminazione di possibili componenti ad attività estrogenica dal terreno di coltura permette di evidenziare, relativamente al gene PDZK, una risposta trascrizionale già dopo 4 h di trattamento (fig. 26). Come ci si aspettava, invece, nelle stesse condizioni sperimentali, l'estradiolo non è in grado di influenzare la via di segnalazione del recettore arilico (fig. 27).

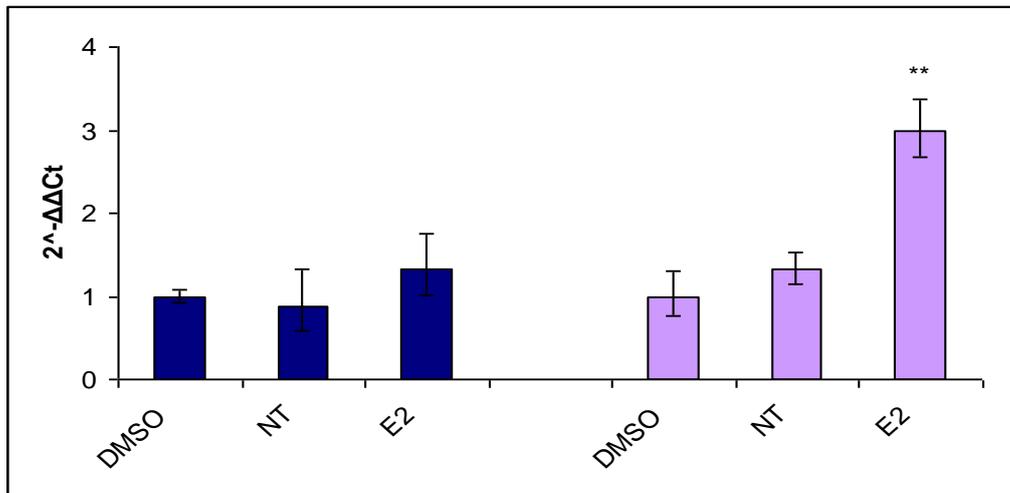


Fig. 26 Modulazione del gene PDZK dopo trattamento di 4 h. In blu Sono rappresentati i risultati della modulazione genica dopo aver mantenuto le cellule in coltura per due giorni in terreno completo; in viola sono rappresentati i risultati della modulazione genica dopo aver mantenuto le cellule in coltura per due giorni in terreno deestrogenato. ** P< 0.01, differenza altamente significativa rispetto al DMSO valutata mediante Test T.

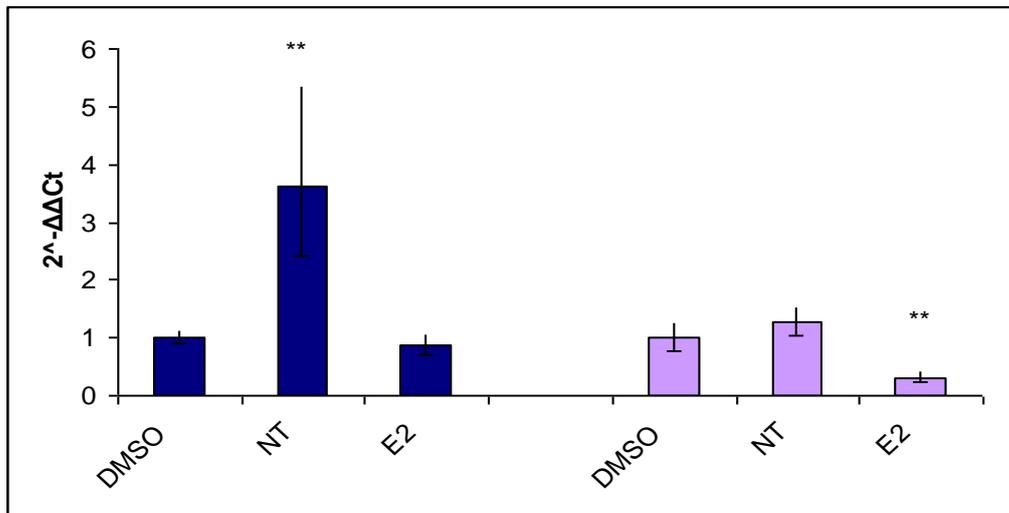


Fig. 27 Modulazione del gene CYP1A1 dopo trattamento di 4 h. In blu Sono rappresentati i risultati della modulazione genica dopo aver mantenuto le cellule in coltura per due giorni in terreno completo; in viola sono rappresentati i risultati della modulazione genica dopo aver mantenuto le cellule in coltura per due giorni in terreno de estrogenato. ** P< 0.01, differenza altamente significativa rispetto al DMSO valutata mediante Test T.

In seguito a quanto ottenuto in questi esperimenti, si è deciso di effettuare le successive prove mantenendo le cellule in terreno deestrogenato nei due giorni precedenti il trattamento, per poter valutare gli effetti sui marcatori di *pathway* di dosi di MIX dei 18 congeneri, PCB 118 e 153 inferiori alla GI50 e confrontabili ai limiti massimi residui.

Si è voluto mantenere un range di dosi ampio che tenesse conto sia delle dosi vicine alla GI50 ottenuta dai test funzionali, sia delle dosi vicine ai limiti massimi residui, riportati nel capitolo dedicato ai PCB.

Si è poi proseguito con la valutazione della modulazione dei geni CYP1A1 e PDZK dopo trattamento di 4 ore con il Mix di 18 congeneri, con il PCB 118 e con il PCB 153, in un range di dosi compreso tra 25 pM e 25 μ M (fig. 28-32).

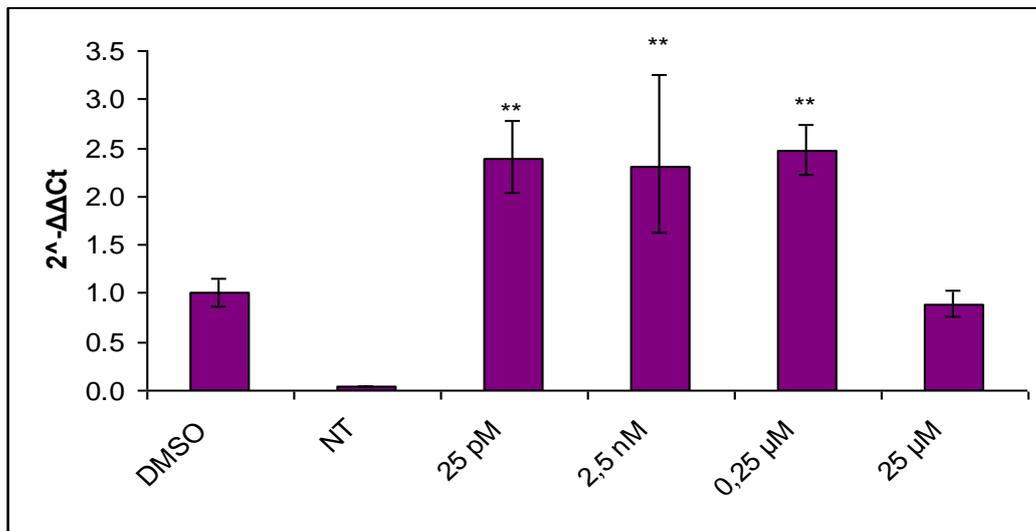


Fig. 28 Modulazione del gene CYP1A1 dopo trattamento di 4 h con il MIX di 18 congeneri. ** $P < 0.01$, differenza altamente significativa rispetto al DMSO valutata mediante Test T.

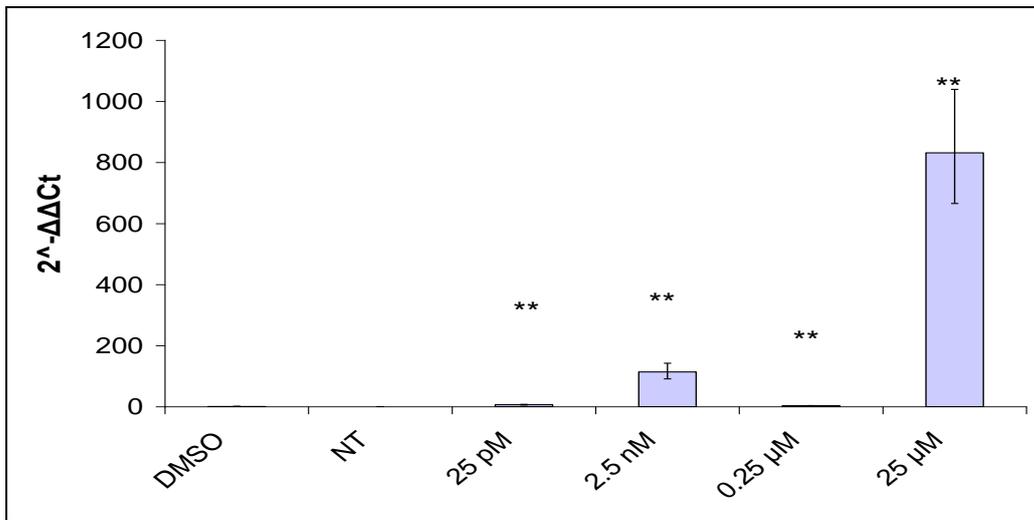


Fig. 29 Modulazione del gene CYP1A1 dopo trattamento di 4 h con il PCB 118. ** P< 0.01, differenza altamente significativa rispetto al DMSO valutata mediante Test T.

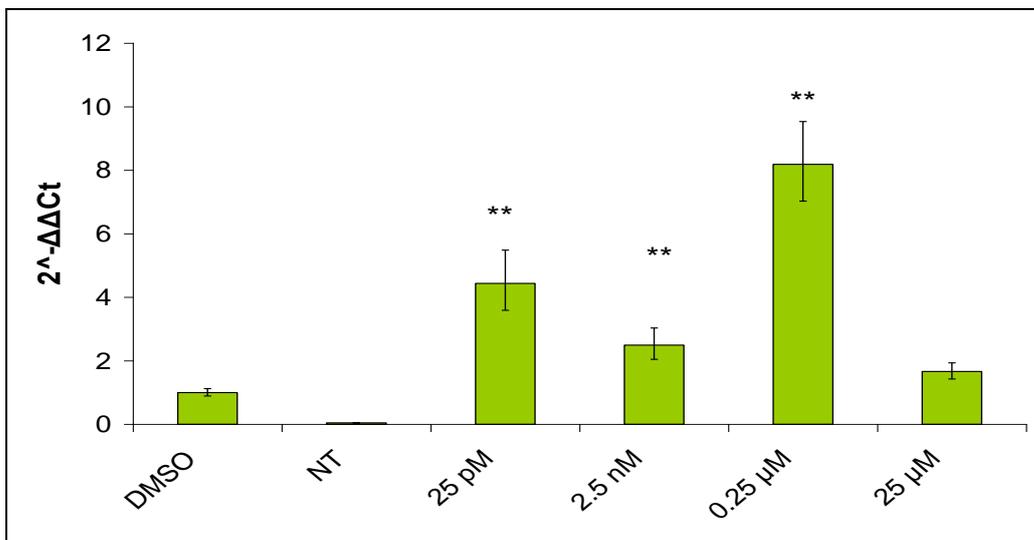


Fig. 30 Modulazione del gene CYP1A1 dopo trattamento di 4 h con il PCB 153. ** P< 0.01, differenza altamente significativa rispetto al DMSO valutata mediante Test T.

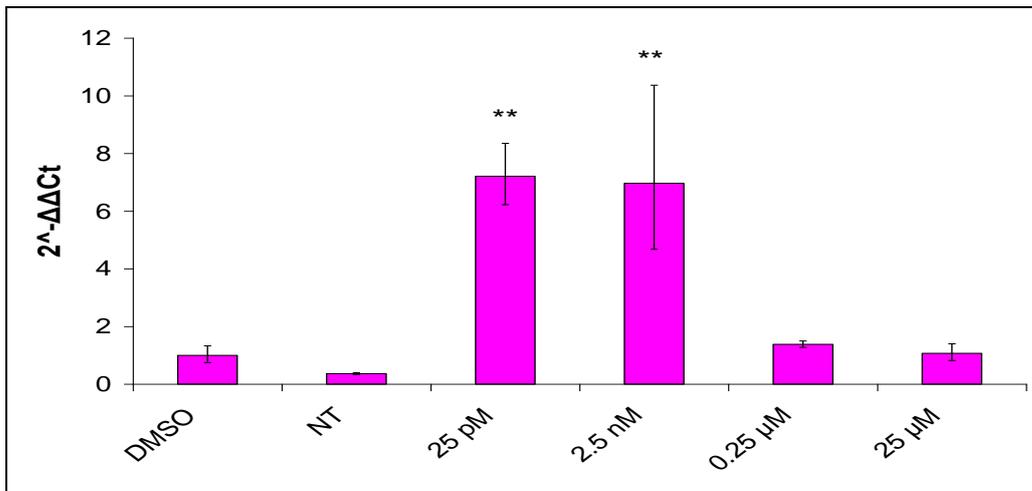


Fig. 31 Modulazione del gene PDZK dopo trattamento di 4 h con il MIX di 18 congeneri. ** P< 0.01, differenza altamente significativa rispetto al DMSO valutata mediante Test T.

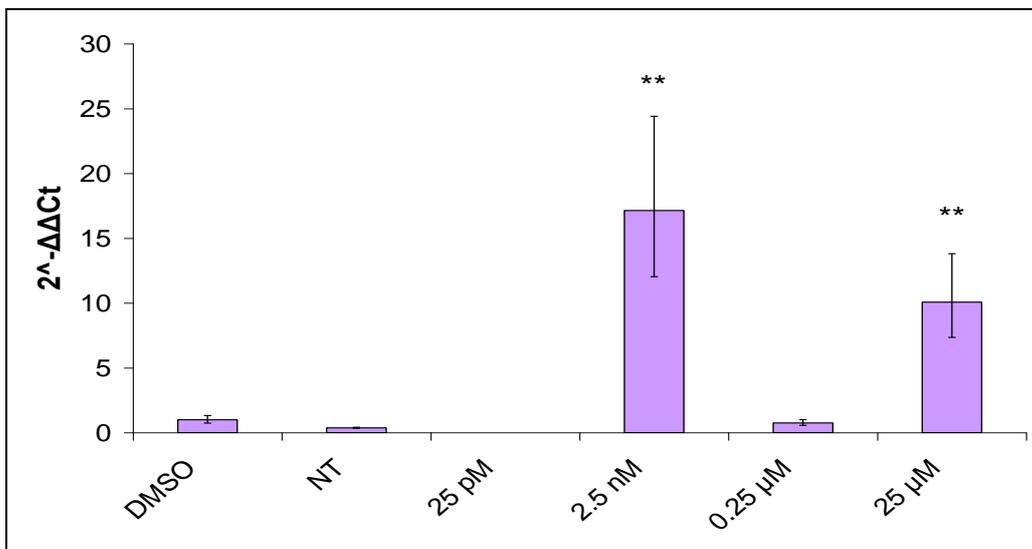


Fig. 32 Modulazione del gene PDZK dopo trattamento di 4 h con il PCB 153. ** P< 0.01, differenza altamente significativa rispetto al DMSO valutata mediante Test T.

Per tutti i composti in esame è possibile evidenziare una risposta trascrizionale a dosi più basse rispetto alla concentrazione 25 μ M sia per quanto riguarda il gene PDZK sia per CYP1A1.

Al fine di verificare l'applicabilità di *biomarkers* di espressione a situazioni di contaminazioni reali, ci si è focalizzati su campioni estratti da matrici ambientali. In particolare alla linea cellulare T47D sono state somministrate due dosi di trattamento con sedimenti provenienti da siti contaminati da PCB, Crevalcore (Crev) e Chiaro Magni (CM) (fig. 33), ed è stata valutata l'induzione della espressione di CYP1A1.

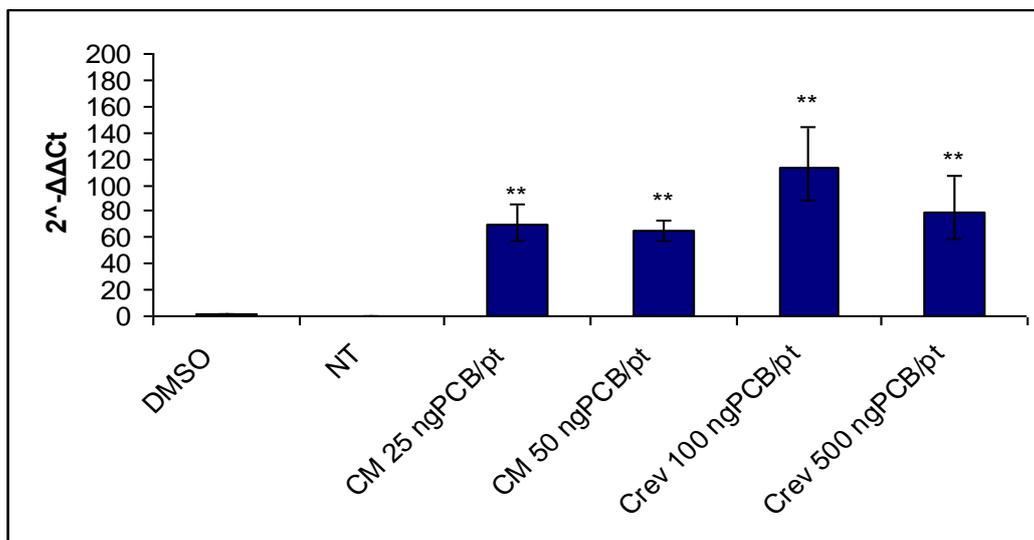


Fig. 33 Modulazione del gene CYP1A1 dopo trattamento di 4 h con il sedimento Chiaro Magni e Crevalcore. ** P < 0.01, differenza altamente significativa rispetto al DMSO valutata mediante Test T.

Il gene CYP1A1 risulta modulato in maniera altamente significativa con entrambi gli estratti di terreno.

L'entità della modulazione non è direttamente correlata con la quantità di PCB, determinata con l'analisi chimica, alla quale le cellule sono state esposte.

Microarray

L'esperimento di *Microarray* è stato eseguito sulla linea cellulare BALB/c 3T3. Tale esperimento è stato eseguito per valutare la modulazione dell'espressione genica indotta dalla miscela di A1260, e dai due campioni ottenuti da matrici reali, Crevalcore e Chiaro Magni.

Per l'analisi dei dati e la normalizzazione si è utilizzato *GeneSpring GX*. Per tutti i campioni si sono scelti i geni totali modulati in maniera statisticamente significativa ($p < 0.05$). In seguito a trattamento con A1260 i geni risultano essere 616, quelli modulati dal trattamento con il sedimento di Crevalcore sono 1214 mentre quelli modulati dal trattamento con il sedimento di Chiaro Magni sono 1337. Il risultato è sintetizzato in figura 34.

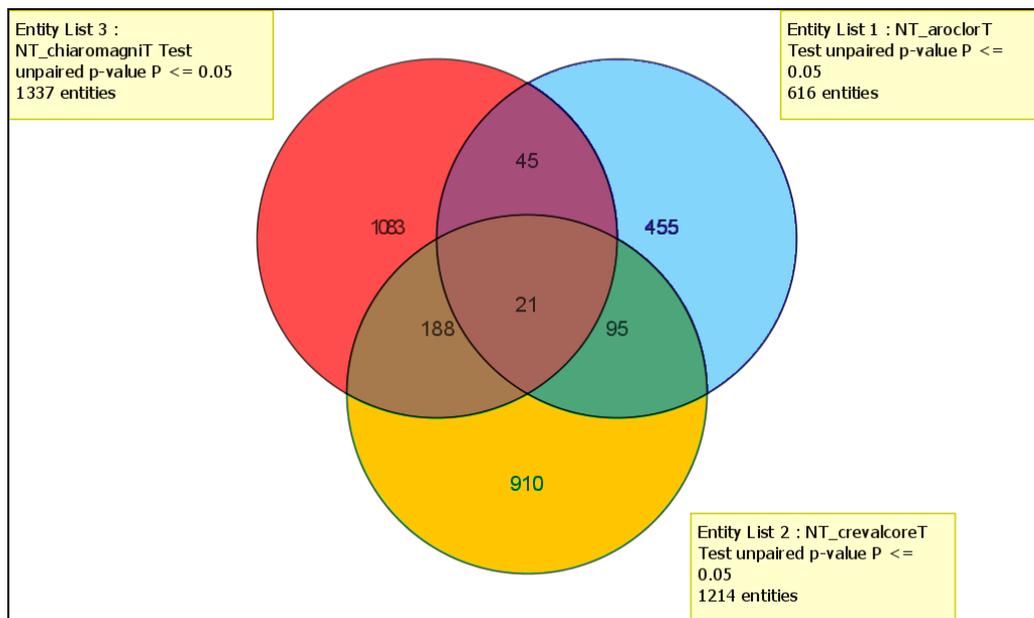


Fig.34 Visualizzazione grafica del numero di geni modulati, in maniera significativa con p-value <0.05, nelle 3 categorie in esame.

Dalla sovrapposizione delle tre liste si ottiene una lista comune di geni modulati. In particolare si ottengono 21 geni il cui elenco è presentato in tabella 1.

Nome comune	Nome del gene	Descrizione
TC1637218	TC1637218	BC004933 RCC2 protein {Homo sapiens}
BC053524	Ipo7	Mus musculus importin 7, mRNA
AK173068	Ick	Mus musculus mRNA for mKIAA0936 protein
AK036787	AK036787	Mus musculus adult female vagina cDNA
AK020480	9430069I07Rik	Mus musculus 12 days embryo embryonic body
TC1646568	TC1646568	AF030110 regulator of G protein signaling RGS12 {Homo sapiens}
NM_011603	Tbpl1	Mus musculus TATA box binding protein-like 1
NM_023737	Ehhadh	Mus musculus enoyl-Coenzyme A
AK019053	AK019053	Mus musculus adult male stomach cDNA
NM_025675	Atpbd4	Mus musculus ATP binding domain 4
NM_001012310	AI132487	Mus musculus expressed sequence AI132487
NM_013498	Crem	Mus musculus cAMP responsive element modulator (Crem)
NM_007992	Fbln2	Mus musculus fibulin 2 (Fbln2), transcript variant 1
ENSMUST00000088612	ENSMUST00000088612	fibroblast growth factor 13
NAP124154-1	NAP124154-1	
NM_011325	Scnn1b	Mus musculus sodium channel, nonvoltage-gated 1 beta
NM_008684	Neol	Mus musculus neogenin (Neol), transcript variant 1
XM_136015	EG212753	PREDICTED: Mus musculus hypothetical LOC212753
NM_175097	Lmo6	Mus musculus LIM domain only 6
AK087354	Arid4a	Mus musculus 0 day neonate lung cDNA
AK087003	AK087003	Mus musculus 0 day neonate lung cDNA

Tab. 1

Discussione

L'interesse della comunità scientifica nei confronti dei policlorodifenili è ormai accertato. I meccanismi d'azione con i quali tali molecole agiscono sono complessi e di difficile interpretazione, tuttavia da ormai più di vent'anni si cerca di chiarire gli effetti acuti e cronici provocati sia dalle miscele tecniche commerciali che dai singoli congeneri, in considerazione della loro diffusione e persistenza nell'ambiente e della possibilità di bioaccumulo lungo la catena trofica (Pavan et al. 2003).

Gli studi effettuati, sia *in vivo* che *in vitro*, hanno confermato, nel corso degli anni, la pericolosità e la potenza di tali miscele e la necessità di continuare ad indagare sui possibili meccanismi d'azione per meglio comprenderne gli effetti.

Già nel 1985 Safe comprese l'importanza di iniziare a mettere in relazione la struttura di ogni congenere con il possibile meccanismo d'azione (Safe 1985).

Norback nello stesso anno effettuò uno dei primi studi *in vivo* su ratti del ceppo Sprague-Dawley; agli animali, suddivisi anche in base al sesso, vennero somministrate con la dieta dosi diverse e per tempi diversi della miscela commerciale di A1260 (Norback et al. 1985). Dallo studio emerse un aumento dell'incidenza di epatocarcinoma nelle femmine piuttosto che nei maschi e tale dato confermava risultati già ottenuti su ratti del ceppo Donryu (Kimura et al. 1973).

Il lavoro sperimentale qui presentato si è orientato, in un primo tempo, sulla valutazione del profilo tossicologico *in vitro* della miscela commerciale di

A1260. La scelta è stata fatta in rapporto a quanto riscontrato in letteratura. Tale miscela è infatti caratterizzata da elevata tossicità e capacità di indurre la comparsa di tumore nei ratti *in vivo*. Tra diverse miscele commerciali, come l'A1016, il 1242 e il 1254, l'A1260 sembra essere una delle più potenti nell'indurre effetti avversi (Cogliano 1998).

Inoltre, ci si è basati anche sulla necessità di sottoporre il nostro modello sperimentale ad un insieme di PCB che rispecchi situazioni reali di contaminazione ambientale, costituite da miscele eterogenee di congeneri, la cui composizione determina anche un diverso tipo di comportamento e tossicità.

Aspetto da non sottovalutare è la difficoltà di utilizzo di tali miscele, dovuta al fatto che i PCB sono poco solubili in ambiente acquoso e, quindi, difficilmente veicolabili. In letteratura sono numerosi gli autori che, pur utilizzando linee cellulari diverse tra loro e lavorando su meccanismi d'azione diversi, hanno riscontrato questo tipo di problema.

Hestermann (2000) effettuò studi specifici per valutare l'impatto del siero presente nel terreno di coltura, osservando che c'è una riduzione degli effetti indotti dai PCB in presenza di siero. Sembra che le proteine del siero leghino i PCB sciolti nel terreno diminuendone la quantità disponibile per le cellule e conseguentemente la risposta legata ad una dose specifica (Hestermann et al. 2000).

Lee (2001), studiando gli effetti dei PCB sulla caspasi-3 nella linea cellulare HL-60, riscontrò una

diversificazione nella risposta in relazione alla presenza o meno di siero nel terreno di coltura.

Dai lavori di Dreth (1998) e di Oenga (2004) si evince la possibilità di ridurre le interferenze utilizzando del siero privato di parte della componente proteica mediante trattamento termico, da aggiungere al terreno di coltura.

Il lavoro oggetto di questa tesi ha preso inizio con la valutazione *in vitro* degli effetti di A1260 veicolato in esano, mediante i modelli sperimentali utilizzati di routine nel laboratorio. I risultati ottenuti sembrano confermare una differenza di risposta determinata dalle condizioni di trattamento. Il sistema sembra essere meno sensibile all'azione di A1260 in presenza di siero completo. Per essere certi di mettere in luce gli effetti legati alla somministrazione delle dosi più basse, i successivi test sono stati condotti utilizzando del siero deproteizzato; come atteso è stato osservato un aumento della sensibilità del sistema, con differenze significative tra il controllo solvente e le dosi di A1260 utilizzate.

Le risposte ai trattamenti, tuttavia, non sono sempre risultate di tipo dose-relato; se si osserva, nello specifico, l'andamento della risposta rispetto alle diverse dosi esaminate, si nota che la frequenza di trasformazione tende a diminuire. Si è ipotizzato che l'assenza di una risposta direttamente correlata al quantitativo di trattamento potesse dipendere dall'incapacità del solvente (esano) di veicolare nel modo migliore il composto. Tale possibilità non è da escludere, se si tiene anche presente che, nei lavori

fin'ora citati, le miscele commerciali e i PCB singoli erano stati veicolati in DMSO.

Passando all'utilizzo del DMSO come solvente, si è andati a rivalutare sia la capacità citotossica che quella trasformante di A1260 e, contemporaneamente, saggiare la miscela dei 18 congeneri. Il DMSO risulta essere più adatto sia per le sue proprietà veicolanti sia perché ci permette di aumentare le dosi di trattamento senza, per questo, arrivare ad una concentrazione tossica di solvente stesso.

Alla dose più elevata (20 μM) sia l'A1260 che il MIX risultano trasformanti in maniera significativa. I risultati ottenuti sembrano quindi confermare il potenziale cancerogeno di queste sostanze, dato che il test di trasformazione cellulare *in vitro* si basa sull'assunto che i meccanismi che determinano il fenotipo trasformato siano gli stessi che sottendono il processo di cancerogenesi *in vivo* (Barret et al. 1986). L'uso di modelli di trasformazione *in vitro* potrebbe contribuire quindi alla delucidazione di variazioni a livello molecolare responsabili del fenotipo trasformato e alla classificazione di cancerogenesi di composti o miscele complesse come quelle estratte da matrici ambientali, per cui non sono possibili gli studi su animali.

Da non sottovalutare, inoltre, è la capacità di alcune miscele commerciali e di PCB singoli di agire come interferenti endocrini (IE).

In natura molte molecole hanno la capacità di agire come *endocrine disruptors chemicals* (EDCs). Nella terminologia scientifica per IE si intendono sostanze

in grado di penetrare nell'organismo, interagire con il sistema endocrino e mimare con effetti sinergici o antagonisti l'azione di ormoni naturali. Gli IE comprendono una grande varietà di composti chimici appartenenti a diverse classi, varietà che ovviamente rende il loro studio più complesso.

Tali agenti sono in grado di interferire con la produzione, il rilascio, il trasporto, il metabolismo degli ormoni fisiologici (estrogeni, androgeni, ormoni tiroidei) responsabili del mantenimento dell'omeostasi dell'organismo e della regolazione dei processi di sviluppo, anche se i meccanismi di azione non sono ancora del tutto chiariti (Waring et al. 2005).

La varietà in strutture chimiche degli IE, messa in relazione con i possibili meccanismi di azione, è fonte di grande perplessità; uno dei dubbi maggiormente sollevati è quello di come la diversità strutturale di tali composti possa interagire con una ristretta cerchia di recettori, che poi attivano varie vie di trasduzione del segnale, vari fattori di trascrizione o entrambi contemporaneamente, dando origine a una risposta pleiotropica. Ad esempio, la diossina, una volta legata al recettore AhR, produce una risposta che coinvolge maggiormente l'attività degli enzimi di fase I per il metabolismo degli xenobiotici, ma anche vie di trasduzione del segnale, espressione di fattori di crescita e processi di angiogenesi (Okey et al. 2005, Hankinson 1995).

I metaboliti idrossilati dei PCB sono inibitori competitivi che agiscono a livello della proteina di trasporto degli ormoni tiroidei (Miyazaki et al. 2004),

per cui la presenza di tali composti all'interno dell'organismo va ad alterare tutta una serie di risposte essenziali all'organismo stesso.

Studi sulla linea cellulare MCF7 (Zou 2002) con miscele commerciali hanno dimostrato che non tutte sono in grado di indurre una risposta estrogenica, nello specifico l'A1260 non è risultato estrogenico a differenza dell'A1242 e 1248.

Decastro (2006) si è invece occupato di congeneri singoli; solo alcuni tra tutti quelli analizzati (PCB 44, 49, 66, 74, 82, 99, 128 e 179) sono risultati estrogenici sulla linea cellulare MCF7; in particolare per la valutazione del potenziale estrogenico è stato utilizzato il saggio di E-screen già elaborato da Soto (1995, 2004) e rivelatosi strumento utile per questo tipo di valutazione.

Nel presente studio, il saggio di E-screen è stato preceduto da test di vitalità eseguiti sulle diverse linee cellulari, BALB/c 3T3, MCF7 e T47D, che hanno permesso di ricavare i valori di GI50, ovvero la concentrazione di molecola che induce il 50% di inibizione della crescita. Tale valore è stato calcolato sia per la miscela di A1260, che per il MIX dei 18 congeneri che per i due congeneri singoli. Per le prime due miscele si aggira intorno alla dose di 25 μ M mentre per il PCB 118 e per il 153 il valore è più elevato. Facendo riferimento al dato ottenuto per la miscela commerciale e per il MIX, le successive analisi sul potenziale estrogenico delle molecole attraverso i test funzionali hanno mantenuto la dose di 25 μ M come dose massima, scendendo poi a dosi più basse vicine ai

limiti di legge sulla contaminazione. Per uniformità, la dose massima di 25 μ M è stata mantenuta anche negli esperimenti in cui sono stati analizzati i due congeneri specifici.

I risultati ottenuti esponendo cellule responsive (T47D ER⁺) all'A1260 sembrano confermare quelli ottenuti da Zou (2002), in quanto la miscela non risulta essere estrogenica. Per quanto riguarda il MIX dei 18 congeneri, non ci sono dati di letteratura con i quali sia possibile confrontarsi; da quanto emerge dal test, non sembra ci siano effetti estrogenici significativi se si somministra la sola MIX in dosi crescenti. Se la miscela viene somministrata contemporaneamente alla dose di E2 che induce la crescita massimale, si osserva un aumento significativo della crescita rispetto all'E2 da solo per le dosi più basse di MIX. Questo porterebbe a ipotizzare un possibile potenziamento dell'effetto di E2 da parte del MIX dei 18 congeneri, che dovrebbe essere maggiormente approfondito; solo due congeneri presenti nella miscela (il PCB 99 e il 110) risultano, infatti, capaci di attività estrogenica su cellule MCF7 (Decastro et al. 2006).

I PCB singoli oggetto di studio, come già affermato da Decastro (2006), non sembrano indurre effetti estrogenici, e non si riscontrano effetti antiestrogenici. Il PCB 153 era stato saggiato già da Bonefeld-Jorgensen (2001) su cellule MCF7 e la risposta è analoga a quella ottenuta sulle T47D. Il PCB 118, Dioxin-Like, conferma la sua non estrogenicità anche sulla linea MCF7 (Radice et al. 2008).

Tuttavia, poiché i test funzionali hanno un unico *end-point* e non forniscono alcuna informazione sul meccanismo d'azione (Rotchell et al. 2003), si è passati ad un'analisi molecolare utilizzando la *Real Time-PCR*. Tale tecnica, combinata all'uso dei *microarray*, negli ultimi anni ha notevolmente migliorato l'approccio allo studio degli effetti biologici divenendo parte integrante del lavoro dei ricercatori. L'uso di queste tecniche innovative combinato alle tecniche biologiche tradizionali aumenta le possibilità di conoscere le funzioni e i ruoli dei geni e delle proteine di interesse cercando, anche, di capire quali sono i meccanismi alla base dei malfunzionamenti e dei danni indotti da specifiche sostanze (Lockhart et al. 2000).

Sulla base dei risultati dei test funzionali e nell'ottica di acquisire informazioni sugli effetti biologici di PCB, singoli o in miscele complesse, si è proseguito il lavoro andando a valutare gli effetti del MIX dei 18 congeneri e dei due congeneri singoli sui marcatori (CYP1A1 e PDZK) dei *pathway* di interesse (AhR e ER), dopo aver stabilito i tempi e le condizioni sperimentali per entrambi i geni.

Il pattern di modulazione del MIX sembra essere molto simile a quello indotto da PCB 153 per entrambi i geni, anche se, tuttavia, le risposte non sono dose-related. Il PCB 118 determina una sovraespressione altamente significativa del CYP1A1.

Anche in questo caso, in riferimento alle risposte ottenute con il MIX dei 18 congeneri, non è possibile avere un riscontro con dati di letteratura. Da quanto

emerso dai dati sperimentali, sembra esserci una capacità di tale miscela di indurre sovraespressione, alle dosi più basse saggiate, sia per il gene CYP1A1 che per il gene PDZK.

La modulazione del gene CYP1A1 da parte del PCB 118 conferma quanto emerge dalla letteratura, ovvero la capacità di tale congenere di attivare direttamente il recettore Ah. Gli effetti sul gene PDZK non sono stati valutati, in quanto il PCB 118 è un Dioxin-like non estrogenico e il suo coinvolgimento nei processi di tipo estrogenico non coinvolgono il recettore ER in maniera diretta (Oh et al. 2007).

Le diossine e i PCB, legandosi all'AhR, attivano una catena di reazioni a cascata, nella quale viene coinvolta la modulazione di diversi geni, tra cui, è ormai accertato, il CYP1A1. Inoltre un aspetto da non sottovalutare è che queste interazioni sono in grado anche di interferire con le vie estrogeniche di trasduzione del segnale. Già Navas (1998) aveva attribuito ad agonisti del recettore arilico la capacità di avere un potenziale effetto antiestrogenico, che determina una down-regolazione del recettore per gli estrogeni. Oh (2007) ha effettuato uno studio sulla possibile relazione che emerge tra alcuni congeneri e l'attivazione/inibizione del recettore arilico e del recettore per gli estrogeni. Gli studi sono stati eseguiti su PCB singoli e su miscele di più congeneri per valutare il possibile effetto antiestrogenico o la loro interazione con l'AhR. La miscela costituita dal PCB 138, 153 e 180 ad elevate concentrazioni (10^{-5} M) mostra un significativo

effetto antiestrogenico. L'attività del PCB 118 è analoga a quella della diossina, andando ad alterare le funzioni riproduttive ed endocrine legando l'AhR e non agendo direttamente sull'ER, come già affermato da Zacharewski (1991).

La modulazione indotta dal PCB 153 negli esperimenti da noi condotti non è univoca e comunque di difficile interpretazione.

E' assodato che l'interferenza di questo tipo di inquinanti su recettori fondamentali nei processi di sviluppo e omeostasi cellulare porta ad alterazioni di rilievo (La Rocca et al. 2006). Altro aspetto da non sottovalutare è che esistono evidenze a favore di un diretto coinvolgimento del recettore arilico nella modulazione trascrizionale di geni che partecipano alla regolazione del ciclo cellulare. Gli effetti, tuttavia, indotti variano in rapporto alla linea cellulare oggetto di studio, determinando alterazioni che vanno dalla proliferazione cellulare al differenziamento o all'apoptosi. Tali proprietà suggeriscono che non solo il recettore Ah ha la capacità di indurre gli enzimi detossificanti di fase I, ma anche di alterare il funzionamento di uno o più componenti della regolazione del ciclo (Puga et al. 2002, Andrysik et al. 2007).

Ge (1998) ed Elferik (2001) avevano già evidenziato la formazione di un complesso proteico tra il recettore arilico e le proteine del retinoblastoma, studiando la capacità di tale complesso di inibire l'avanzamento del ciclo cellulare. Tale ipotesi suggeriva che un'ulteriore funzione dell'AhR fosse quella di fungere da

sentinella in caso di presenza di inquinanti ambientali inducendo l'arresto del ciclo.

I test biologici basati sul meccanismo d'azione dei contaminanti ambientali sono considerati di grande interesse per le loro potenzialità. Costituiscono, infatti, dei sistemi sperimentali rapidi ed economici per verificare la presenza in matrici ambientali di contaminanti e di loro miscele complesse, responsabili di effetti cronici e subletali negli organismi esposti, correlandola ad uno specifico meccanismo d'azione che ne determina la tossicità (Egger et al. 2003).

La misura dell'induzione di CYP1A1 sia in termini di espressione del trascritto che dell'attività dell'enzima EROD (EtossiResorufina (O) Dietilasi), può essere utilizzata come *biomarker* per il monitoraggio di sedimenti marini contaminati. Tuttavia non sempre è possibile osservare una relazione dose-risposta tra le concentrazioni di certi inquinanti nel sedimento e l'espressione e/o l'attività di CYP1A1, dato che le miscele di contaminanti possono contenere sia attivatori che inibitori di CYP1A1 (Sarkar et al. 2006).

Come già accennato, il lavoro si è concluso con un primo passo verso una valutazione di tipo molecolare e genico su matrici ambientali rappresentative di contaminazioni reali. In particolare sedimenti contaminati da PCB e diossine hanno costituito la matrice di riferimento sulla quale si è andati a verificare la capacità di modulazione del gene di interesse (CYP1A1) in cellule *target* e ricavare la

lista di geni modulati dopo analisi in esperimenti di *microarray*.

A causa della limitata disponibilità di campione ambientale, l'approccio scelto è stato esclusivamente di tipo molecolare, per poi individuare *pathways* specifici da valutare in test funzionali.

Si è deciso di valutare due dosi per campione, la massima veicolabile dal solvente e la diluizione 1:2. In *Real Time-PCR* si è valutata la modulazione del solo gene CYP1A1, in quanto questo gene è considerato un *biomarker* sensibile e specifico per contaminazioni ambientali da PCB e diossine (Frent 2003). Per avere un confronto diretto sul tipo di risposta si è condotta l'analisi sulla linea T47D. La modulazione del gene in esame è risultata decisamente significativa, anche se di entità minore rispetto a quella che si ottiene con il PCB 118, induttore diretto del CYP1A1 (Oh et al. 2007).

Inoltre è stato osservato che la distruzione dei contatti intercellulari attiva, in modo elevato ma transitorio, la trascrizione mediata da AhR in fibroblasti 10T1/2 (Cho et al. 2004). E' interessante rilevare che, dopo trattamento con i campioni ambientali, è stata osservata una tendenza delle cellule a distaccarsi dal substrato.

L'analisi è poi proseguita valutando le modulazioni trascrizionali mediante la tecnica dei *microarray*. Il target cellulare utilizzato è stato, in questo caso, la linea BALB/3T3. La risposta trascrizionale ad A1260 e ai campioni di sedimento è stata ottenuta su di una linea non tumorale, anche se immortalizzata, al fine di

correlare eventuali modulazioni di espressione con effetti biologici su cellule non trasformate.

Nello specifico si sono eseguiti esperimenti di array ibridizzando RNA ottenuti a seguito di trattamento con i sedimenti di Chiaro Magni e di Crevalcore, con la miscela di molecola pura di A1260 e con il DMSO. La modulazione dell'espressione genica è stata calcolata confrontando ogni array con l'array di controllo (DMSO), ottenendo per ogni gene un valore di *fold change*. Per ogni trattamento si sono ottenute delle liste di geni. La sovrapposizione delle tre liste ha avuto l'intento di confrontare le modulazioni indotte dai campioni ambientali contaminati da PCB e diossine con quelle indotte da uno standard di riferimento, l'A1260, per ottenere una lista di geni comune.

E' stata ricavata una lista di 21 geni che risultano modulati sia dall'A1260 che dagli estratti organici di sedimenti. Su questa lista è in corso un'analisi biologica per verificare la possibile implicazione di questi geni in processi biologici di rilievo. La modulazione dovrà essere confermata con esperimenti di RT-PCR, dopo aver costruito dei *primers* specifici, per proporre uno o più geni come *biomarkers* di effetti trascrizionali indotti da PCB da utilizzare in studi tossicologici ed ecotossicologici.

Lo scopo ultimo potrebbe essere rilevare una contaminazione da PCB e diossine andando a valutare le modulazioni di interesse di uno solo o di un pacchetto di geni specifici direttamente sulla matrice in esame. Un progetto di questo tipo risulta essere estremamente ambizioso se si considerano i vantaggi apportati, da un

lato in rapporto ai tempi di analisi e dall'altro alla specificità di risposta, ma naturalmente occorre percorrere ancora molta strada prima di poter raggiungere quest'obiettivo.

Bibliografia

- Ahlborg U.G. et al. (1994) Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs: Report on a WHO-ECEH and IPCS consultation, December 1993. Chemosphere Vol. 28(6): 1049-1067.
- Andrysik Z. et al. (2007). The aryl hydrocarbon receptor-dependent deregulation of cell cycle control induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells. Mutat. Res. Vol. 615: 87-97.
- Ballschmiter K. et al. (1980) Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. Fresenius J Anal Chem 302: 20-31.
- Barrett J.C. et al. (1986) Long-term assays for carcinogens: a critical appraisal. IARC Sci. Publ. 83, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 267-286.
- Bonefeld-Jorgensen E.C. et al. (2001) Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. Toxicology Vol 158: 141-153.
- Borlak J. et al. (2003) DNA adducts in cultures of polychlorinated biphenyl-treated human hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol Vol. 188(2): 81-91.
- Cho Y.C. et al. (2004) Disruption of cell-cell contact maximally but transiently activates AhR-mediated transcription in 10T1/2 fibroblasts. Toxicol. Appl. Pharmacol. Vol. 199: 220-238.

- Cogliano V.J. (1998) Assessing the cancer risk from environmental PCBs. *Environ. Health Perspect.* Vol 106: 317-323.
- Decastro B.R. et al. (2006) Estrogenic Activity of Polychlorinated Biphenyls Present in Human Tissue and the Environment. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 40: 2819-2825.
- Denison M.S. et al. (1986) Structure and function of the Ah receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Species difference in molecular properties of the receptors from mouse and rat hepatic cytosols. *J Biol Chem.* Vol. 261(9): 3987-95.
- Dolwick K.M. et al. (1993) In vitro analysis of Ah receptor domains involved in ligand-activated DNA recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Vol. 90(18): 8566-70.
- Drenth H.J. et al. (1998) Effects of some persistent halogenated environmental contaminants on aromatase (CYP19) activity in the human choriocarcinoma cell line JEG-3. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.* Vol. 148: 50-55.
- Eggen R.I.L. et al. (2003) The potential of mechanism-based bioanalytical tools in ecotoxicological exposure and effect assessment *Anal Bioanal Chem* Vol.377: 386-396.
- Elferink C.J. et al. (2001) Maximal aryl hydrocarbon receptor activity depends on an interaction with the retinoblastoma protein. *Mol. Pharmacol.* Vol. 59: 664-673.

- Environmental Protection Agency. Polychlorinated biphenyls (PCBs). Integrated risk information system 2005. Available from: <http://www.epa.gov/iris/subst/0294.htm>. Last visited 20/4/06.
- European Commission. Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risk assessment of dioxin and dioxin-like PCBs in food. Adopted on 22 November 2000. SCF/CS/CNTM/DIOXIN/8final.
- Fiedler H. (2001) Polychlorinated Biphenyls (PCB).
- Frent K. (2003) Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. Toxicology Letters Vol. 140_/141: 353-365.
- GAZZETTA UFFICIALE (7-6-2007) supplemento ordinario n. 130.
- Ge N.L. et al. (1998) A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. J. Biol. Chem. Vol. 273: 22708-22713.
- Hankinson O. (1995) The aryl hydrocarbon receptor complex. Annu Rev Pharmacol Toxicol. Vol. 35: 307-40. Review.
- Hansen L.G. (1998) Stepping backward to improve assessment of PCB congener toxicities. Environ. Health Perspect. Vol. 106(1): 171-189.
- Hestermann E.V. et al. (2000) Serum alters the uptake and relative potencies of halogenated aromatic hydrocarbons in cell culture bioassays. Toxicol. Sci. Vol. 53: 316-325.

- Hoffman E.C. et al (1991) Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. Science Vol. 252(5008): 954-8.
- International Agency for Research on Cancer. Polychlorinated biphenyls 1987; Vol.18, p. 43. Last updated: 11 February 1998.
- Istituto Superiore di Sanità 1123-3117 Rapporti ISTISAN 07/50.
- Istituto Superiore di Sanità, parere, num. di protocollo: 37306 del 12-08-2002.
- Kafafi S.A. et al. (1993) Binding of polychlorinated biphenyls to the Aryl Hydrocarbon receptor. Environ. Health Perspect. Vol. 101(5): 422-428.
- Kimura N.T. et al. (1973) Neoplastic changes in the rat liver induced by polychlorinated biphenyl. Gann Vol. 64: 105-108.
- Knerr S. et al. (2006) Carcinogenicity of "Non-Dioxinlike" Polychlorinated Biphenyls. Critical Reviews in Toxicology Vol 36: 663-694.
- Korner W. et al. (2004) Interlaboratory Comparison of Four *in Vitro* Assays for Assessing Androgenic and Antiandrogenic Activity of Environmental Chemicals. Environ. Health Perspect. Vol. 112(6): 695-702.
- La Rocca C. et al. (2006) From environment to food: the case of PCB. Ann. Ist. Super. Sanità Vol. 42(4): 410-416.
- Lee S.H. et al. (2001) Polychlorinated biphenyls activate caspase-3-like death protease *in vitro*

- but not *in vivo*. Biol. Pharm. Bull. Vol. 24(12): 1380-1383.
- Lin C.H. et al. (2006) Induction of ROS formation, poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, and cell death by PCB126 and PCB153 in human T47D and MDA-MB-231 breast cancer cells. Chem Biol Interact Vol. 162(2):181-94.
 - Livak K.J. et al. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT Method. METHODS Vol. 25: 402-408.
 - Lockhart D.J. et al. (2000) Genomics, gene expression, and DNA arrays. Nature Vol. 405: 827-836.
 - McLean M.R. et al. (1996) Identification of catechol and hydroquinone metabolites of 4-monochlorobiphenyl. Chem Res Toxicol. Vol. 9(1): 158-64.
 - Miyazaki W. et al. (2004) Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone receptor-mediated transcription through a novel mechanism. J. Biol. Chem. Vol. 279(18): 18195-18202.
 - Mols F. et al. (2005) Quality of life among long-term breast cancer survivors: A systematic review. European Journal of Cancer Vol. 41: 2613-2619.
 - NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM P.O. Box 12233 Research Triangle Park, NC 27709 (May 2006) Toxicology and Carcinogenesis Studies of 2,2n,4,4n,5,5n-hexachlorobiphenyl (PCB 153) (CAS NO. 35065-27-1) in female harlan Sprague-Dawley rats (gavage studies).

- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM P.O. Box 12233
Research Triangle Park, NC 27709 (November 2006)
Toxicology and Carcinogenesis Studies of a binary
mixture of 3,3n,4,4n,5-pentachlorobiphenyl (PCB
126) (CAS. NO. 57465-28-8) and 2,3n,4,4n,5-
pentachlorobiphenyl (PCB 118) (CAS NO. 31508-00-6)
in female harlan Sprague-Dawley rats (gavage
studies).
- Navas J.M. et al. (1998) Antiestrogenic activity
of anthropogenic and natural chemicals. Environ.
Sci. Pollut. Res. Vol. 5: 75-82.
- Norback H.D. et al. (1985) Polychlorinated
Biphenyl Induction of Hepatocellular Carcinoma in
the Sprague-Dawley Rat. Environ. Health Perspect.
Vol. 60: 97-105.
- Oenga G.N. et al. (2004) TCDD and PCBs inhibit
cancer cell proliferation in vitro. Toxicol. in
Vitro Vol. 18: 811-819.
- Oh S.M. et al. (2007) Antiestrogenic potentials of
ortho-PCB congeners by single or complex exposure.
Arch Pharm Res. Vol. 30(2): 199-209.
- Okey A.B. et al. (2005) Toxicological implications
of polymorphisms in receptors for xenobiotic
chemicals: The case of the aryl hydrocarbon
receptor. Toxicol Appl Pharmacol. Vol. 207(2): 43-
51.
- Pavan I. et al. (2003) Policlorobifenili: valori
di riferimento. G. Ital. Med. Lav. Erg. Vol.
25(1): 61-67.
- Perdew G.H. (1992) Chemical cross-linking of the
cytosolic and nuclear forms of the Ah receptor in

- hepatoma cell line 1c1c7. *Biochem Biophys Res Commun.* Vol. 182(1): 55-62.
- Pereg D. et al (2002). DNA adduction by polychlorinated biphenyls: adducts derived from hepatic microsomal activation and from synthetic metabolites. *Chem Biol Interact* Vol. 139(2): 129-44.
 - Pérez-Reyes P.L. et al. (2001) Different molecular capacity in the induction of apoptosis by polychlorinated biphenyl congeners in rat renal tubular cell cultures. *Biosci. Rep.* Vol. 21(6): 765-778.
 - Poplawski T. et al. (2005) Polymorphisms of the DNA mismatch repair gene HMSH2 in breast cancer occurrence and progression. *Breast Cancer Research and Treatment.* Vol. 94: 199-204.
 - Puga A. et al. (2002) Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology* Vol. 181-182: 171-177.
 - Radice S. et al. (2008) Different effects of PCB101, PCB118, PCB138 and PCB153 alone or mixed in MCF-7 breast cancer cells. *Food and Chem. Toxicol.* Vol. 46(7): 2561-2567.
 - REGOLAMENTO (CE) N. 1881/2006 DELLA COMMISSIONE del 19 dicembre 2006.
 - Rogers C.G. et al. (1983) In vitro cytotoxicity of polychlorinated biphenyl (aroclor 1016,1242,1254 and 1260) and their effect on phospholipid and neutral lipid composition of chinese hamster ovary (CHO-K1) cell. *Toxicology.* Vol. 26: 113-124.

- Rotchell J.M. et al. (2003) Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *J. Toxicol. Environ. Health, Part B* 6: 453-495.
- Ruzzenenti M. (2001) Un secolo di cloro e PCB. Storia delle industrie Caffaro di Brescia. Jaca Book.
- Safe S.H. (1985) PCBs: Structure-Function Relationships and Mechanism of Action. *Environ. Health Perspect. Vol. 60*: 47-56.
- Safe S.H. (1998) Hazard and Risk Assessment of Chemical Mixtures Using the Toxic Equivalency Factor Approach. *Environ. Health Perspect. Vol. 106(Suppl. 4)*: 1051-1058.
- Sánchez-Alonso J.A. et al. (2004). Polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclor) induce apoptosis via Bcl-2, Bax and caspase-3 proteins in neuronal cell cultures. *Toxicol. Lett. Vol. 153*: 311-326.
- Sarkar A. et al. (2006) Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology Vol. 15*: 333-340.
- Soto A.M. et al. (1995) The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect. Vol. 103(7)*: 113-122.
- Soto A.M. et al. (2004) Androgenic and Estrogenic Activity in Water Bodies Receiving Cattle Feedlot Effluent in Eastern Nebraska, USA. *Environ. Health Perspect. Vol. 112(3)*: 346-352.
- Spink D.C. et al. (1998) Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial

- cells and breast tumor cells. *Carcinogenesis* Vol.19(2): 291-298.
- Strathmann J. et al. (2006) PCB 153, a non-dioxin-like tumor promoter, selects for beta-catenin (Catnb)-mutated mouse liver tumors. *Toxicol Sci* Vol. 93(1): 34-40.
 - Svec J. (2005) Chemoprevention of colorectal cancer. *Bratisl Lek Listy* Vol. 10: 238-239.
 - Szelei J. et al. (1997) Androgen-Induced Inhibition of Proliferation in Human Breast Cancer MCF7 Cells Transfected with Androgen Receptor. *Endocrinology* Vol. 138: 1406-1412.
 - Tharappel J.C. et al. (2002) Regulation of cell proliferation, apoptosis, and transcription factor activities during the promotion of liver carcinogenesis by polychlorinated biphenyls. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* Vol. 179: 172-84.
 - Ufficio federale della sanità pubblica 2002.
 - Van den Berg M. et al. (1998) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* Vol. 106(12): 775-79.
 - Van den Berg M. et al. (2006) The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-Like Compounds. *Toxicological sciences* Vol. 93(2): 223-241.
 - van Larebeke N. et al. (2001) The Belgian PCB and dioxin incident of January-June 1999: exposure data and potential impact on health. *Environ Health Perspect.* Vol. 109(3): 265-73.

- Wang D.Y. et al. (2004) Gene expression profile for detecting and distinguishing potential endocrine-disrupting compounds in environmental samples. *Environ. Science & Technology* Vol. 38(23): 6396-6406.
- Waring R.H. et al. (2005) Endocrine disrupters: A human risk? *Mol. and Cell. Endocrinol.* Vol.244: 2-9.
- Withlock J.P. (1990) Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* Vol. 30: 251-77.
- Wolff M.S. et al. (1995) Environmental organochlorine exposure as a potential etiologic factor in breast cancer. *Environ. Health Perspect.* Vol. 103(Suppl. 7): 141-5.
- Wolff M.S. et al. (1997) Proposed PCB congener groupings for epidemiological studies. *Environ. Health Perspect.* Vol. 105(correspondence): 13-4.
- Zacharewski T. et al. (1991) Evidence for the mechanism of action of the 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated decrease of nuclear estrogen receptor levels in wild-type and mutant mouse hep 1c1c7 cells. *Biochem. Pharmacol.* Vol. 41: 1931-1939.
- Zou E. et al. (2002) Foci formation of MCF7 cells as an in vitro screening method for estrogenic chemicals. *Environ. Toxicol. and Pharmacol* Vol. 11: 71-77.
- <http://dtp.nci.nih.gov>
- www.efsa.europa.eu

- <http://www.epa.gov/osw/hazard/tsd/pcbs/pubs/effects.htm>
- <http://eur-lex.europa.eu>
- <http://frodo.wi.mit.edu/>
- <http://www.inchem.org/documents/iarc/suppl7/polychlorinatedbiphenyls.html>
- www.ambientebrescia.it
- www.atsdr.cdc.gov/toxprofile/tp17.pdf
- www.csgi.unifi.it
- www.epa.gov/pcbs/pubs/effects.htm
- www.regione.emilia-romagna.it