



APAT

Agenzia per la protezione
dell'ambiente e per i servizi tecnici

Valutazione della genotossicità di inquinanti in ambienti acquatici: messa a punto di metodi per l'esecuzione del test del micronucleo in eritrociti di specie ittiche

Informazioni legali

L'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici o le persone che agiscono per conto dell'Agenzia stessa non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo rapporto.

APAT - Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici
Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma
www.sinanet.apat.it

© APAT, Manuali e Linee Guida 32/2005

ISBN 88-448-0143-6

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

APAT

Grafica di copertina: F. Iozzoli

Foto: Daniela Conti

Coordinamento tipografico

APAT - Servizio di Supporto alla Direzione Generale
Settore Editoria, Divulgazione e Grafica

Impaginazione e stampa

I.G.E.R. srl - Viale C.T. Odiscalchi, 67/A - 00147 Roma

Stampato su carta TCF

Finito di stampare maggio 2005

Autori

Daniela Conti Servizio di Metrologia Ambientale APAT
Stefania Balzamo Servizio di Metrologia Ambientale APAT
Maria Belli Servizio di Metrologia Ambientale APAT

Ringraziamenti

Si ringrazia il Laboratorio Ittiologico di ARPA Ferrara per il supporto tecnico-logistico fornito nell'esposizione e nel trattamento della specie ittica utilizzata

Lo studio presentato è stato condotto nell'ambito della convenzione APAT-ICRAM riguardante "Test-chimici e tossicologici per i prodotti disperdenti e assorbenti impiegati nella bonifica degli ambienti marini dalla contaminazione con idrocarburi petroliferi".

1. SOMMARIO

In questo rapporto vengono presentati gli studi, condotti presso il Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT, di messa a punto di metodi per l'esecuzione del test micronucleo (MN test) in eritrociti di specie ittiche.

L'MN test rappresenta uno dei metodi maggiormente impiegati negli studi di genotossicità degli ambienti acquatici. A differenza di altre metodiche citogenetiche, presenta una fattibilità più semplice che lo rendono un biomarcatore rapido e a basso costo negli studi che utilizzano gli organismi acquatici come bioindicatori.

In particolare, viene proposto un protocollo alternativo per l'allestimento dei preparati citologici da analizzare per i micronuclei, al fine di stabilire e controllare la distribuzione cellulare, rendendo la lettura al microscopio più rapida, agevole e accurata. Vengono inoltre stabiliti i criteri di riconoscimento e classificazione delle cellule al microscopio ottico, per uniformare le letture di differenti operatori all'interno del laboratorio e per l'avvio di studi collaborativi ai fini della convalida del metodo.

SUMMARY

A study for procedure development about the micronucleus test (MN test) in peripheral blood erythrocytes of fish specimens, was performed by Environmental Metrology Service of APAT.

The erythrocyte MN assay with fish is one of the simplest test for investigating the genotoxic activity of chemicals in aquatic ecosystems. Among different cytogenetic methods, micronucleus assay has been widely applied because it is reliable and sensitive and has been demonstrated to be a sensitive bioassay for detecting mutagenic pollution.

In particular, an alternative slides preparation protocol for micronucleus analysis is proposed to control cell distribution and to facilitate the optical microscope scoring. Furthermore, criteria for selecting cells and scoring micronuclei are defined to compare interlaboratory scoring results, in order to start collaborative studies for the method validation.

INDICE

1. INTRODUZIONE	11
2. INQUINAMENTO DEGLI AMBIENTI ACQUATICI	13
3. ESPOSIZIONE DEGLI ORGANISMI ED EFFETTI BIOLOGICI	19
3.1 Gli animali acquatici come bioindicatori	22
4. ANALISI DEGLI EFFETTI GENOTOSSICI NEGLI ORGANISMI ACQUATICI	23
4.1 Addotti al DNA	24
4.2 Rotture al DNA: il test della cometa	25
4.3 Danno cromosomico: aberrazioni cromosomiche e scambi tra cromatidi fratelli	26
4.4 Il test del micronucleo	28
5. IL TEST DEL MICRONUCLEO NELLE SPECIE ITTICHE	31
5.1 Studi di laboratorio	35
5.2 Studi in situ	38
6. IL TEST DEL MICRONUCLEO IN ERITROCITI DI <i>DICENTRARCHUS LABRAX</i>	41
6.1 Introduzione	41
6.2 Scopo e campo di applicazione	41
6.3 Principio	42
6.4 Definizioni	42
6.5 Organismi	42
6.6 Reagenti e soluzioni	44
6.7 Strumentazione	44
6.8 Metodo dello striscio	44
6.8.1 Requisiti preliminari	44
6.8.2 Prelievo del sangue: puntura della vena caudale	45
6.8.3 Preparazione degli strisci	45
6.8.4 Colorazione e montaggio dei vetrini	46
6.8.5 Lettura dei vetrini al microscopio ottico	47
6.9 Metodo "Cytospin"	48
6.9.1 Requisiti preliminari	48
6.9.2 Prelievo del sangue: puntura della vena caudale	48
6.9.3 Cytospin	49
6.9.4 Colorazione e montaggio dei vetrini	50
6.9.5 Lettura dei vetrini al microscopio ottico	50

6.10 Criteri di distribuzione e riconoscimento delle cellule al microscopio ottico	50
6.11 Elaborazione dati	58
7. ALLEGATO 1	61
8. BIBLIOGRAFIA	63
9. GLOSSARIO	69

*“L’acqua è la sostanza da cui traggono origine tutte le cose;
la sua scorrevolezza spiega anche i mutamenti delle cose stesse
...animali e piante si nutrono di umidità...gli alimenti sono ricchi di succhi e...
gli esseri viventi si disseccano dopo la morte.”*

TALETE (624 - 546 A.C.)

1. INTRODUZIONE

Le acque oltre ad ospitare un'enorme varietà di organismi viventi, vegetali e animali, organizzati in ecosistemi estremamente complessi, costituiscono un'importantissima risorsa dal punto di vista antropico e "un patrimonio che va protetto, difeso e trattato come tale" (Direttiva 2000/60/CE 2000). Negli ultimi decenni la richiesta d'acqua da parte dell'uomo per uso industriale, agricolo e urbano, è andata costantemente aumentando; al tempo stesso tuttavia, la sua qualità è peggiorata enormemente.

L'inquinamento degli ambienti acquatici costituisce un problema complesso entro cui gli studi che riguardano la presenza di sostanze mutagene e cancerogene non possono essere disgiunti da quelli relativi ad altri agenti tossici. I contaminanti genotossici possono essere individuati o saggiando in vitro campioni ambientali oppure, rilevando il danno genetico indotto dopo l'esposizione, in organismi sentinella. Rilevazioni di questo tipo costituiscono un segnale d'allarme per le possibili conseguenze a lungo termine, come l'instaurarsi di cambiamenti nelle popolazioni, nelle specie e nelle comunità degli organismi esposti (Bolognesi e Venier, 2003).

Sebbene sia noto da tempo che il mantenimento dell'integrità strutturale e funzionale della molecola del DNA è requisito fondamentale per tutti gli esseri viventi, solo alcuni dei parametri di danno genetico studiati (addotti al DNA, rotture al DNA, scambi tra cromatidi fratelli, micronuclei e aberrazioni cromosomiche) sono estesamente utilizzati nelle indagini ambientali che riguardano le acque.

Uno dei test maggiormente impiegati negli studi di genotossicità degli ambienti acquatici è il test del micronucleo. A differenza di altri metodi citogenetici, questo test non implica allestimento di colture cellulari, è indipendente dal numero cromosomico della specie, non presenta eccessive difficoltà di riconoscimento al microscopio ed è di facile esecuzione. Per queste ragioni è stato proposto come biomarcatore rapido e a basso costo negli studi che utilizzano gli organismi acquatici come bioindicatori.

La misura di questo biomarcatore può dipendere da diversi fattori, come la specie utilizzata, il protocollo metodologico impiegato, le condizioni di mantenimento degli animali in corso di esperimento, e altro. Tuttavia a tutt'oggi non si conoscono studi approfonditi circa l'influenza delle diverse variabili sulla frequenza dei micronuclei ed i protocolli sperimentali utilizzati dai vari autori differiscono per numerosi aspetti.

In questo rapporto vengono presentati gli studi, condotti presso il Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT, nell'ambito della convenzione APAT-ICRAM riguardante "Test chimici e tossicologici per i prodotti disperdenti e assorbenti impiegati nella bonifica degli ambienti marini dalla contaminazione con idrocarburi petroliferi" conseguente al Decreto Direttoriale 23 dicembre 2002. Lo studio ha riguardato la messa a punto di metodi per l'esecuzione del test micronucleo in eritrociti di specie ittiche. In particolare viene proposto un protocollo alternativo per l'allestimento dei preparati citologici da analizzare per i micronuclei, al fine di stabilire e controllare la distribuzione cellulare, rendendo la lettura al microscopio più rapida, agevole e accurata.

Vengono inoltre stabiliti i criteri di riconoscimento e classificazione delle cellule al microscopio ottico, per uniformare le letture di differenti operatori all'interno del laboratorio e per l'avvio di studi collaborativi ai fini della convalida del metodo.

2. INQUINAMENTO DEGLI AMBIENTI ACQUATICI

Il Decreto legislativo 152/1999 sulla tutela delle acque definisce l'inquinamento idrico come l'effetto dello "scarico effettuato direttamente o indirettamente dall'uomo nell'ambiente idrico di sostanze o di energia le cui conseguenze siano tali da mettere in pericolo la salute umana, nuocere alle risorse viventi e al sistema ecologico idrico, compromettere le attrattive o ostacolare altri usi legittimi delle acque".

Le tipologie di inquinanti sono numerose, ma di solito essi vengono classificati in due categorie generali: i macroinquinanti e i microinquinanti.

Ai macroinquinanti appartengono le sostanze naturalmente presenti negli ecosistemi, ma il cui aumento di concentrazione provoca fenomeni di tossicità per il biota o crea scompensi all'ecosistema. Sono macroinquinanti i nutrienti (nitrati e fosfati), i solfati, e, in elevate concentrazioni, anche sodio, potassio, magnesio e calcio. Ciascun ecosistema si è evoluto in equilibrio con i nutrienti, per cui l'eccesso di questi, causato dalle attività antropiche, genera squilibri e perturbazioni più o meno reversibili in funzione del grado di resistenza e resilienza.

I microinquinanti sono invece gli elementi o composti presenti normalmente a concentrazioni molto basse (tracce o ultratracce). Ad esempio i metalli pesanti e gli idrocarburi alifatici e aromatici rientrano nella categoria dei microinquinanti naturali, la cui disponibilità viene alterata a seguito della perturbazione dei loro cicli naturali e delle mobilizzazioni dai comparti indisponibili della litosfera come i depositi di combustibili fossili. Le molecole di sintesi poi rappresentano un altro gruppo di sostanze ad elevato potenziale ecotossicologico la cui portata è tutt'oggi oggetto di valutazione. Questo dipende dal fatto che il numero dei composti di sintesi è molto elevato (dell'ordine di centinaia di migliaia) e aumenta continuamente e che molte nuove molecole non ancora sufficientemente studiate vengono comunque liberate nell'ambiente (Leonzio et al., 2003).

Le principali fonti di inquinamento per gli ambienti acquatici sono costituite dagli effluenti urbani e industriali immessi nelle acque superficiali o sotterranee direttamente o dopo trattamento. Gli effluenti urbani contengono principalmente deiezioni, carta, saponi e detersivi sintetici, ma anche quantità variabili di altri inquinanti derivati dalla corrosione delle tubature e più in generale dalle attività domestiche (oli, grassi, solventi) e dal dilavamento delle strade (idrocarburi, gomma). Gli effluenti industriali invece possono contenere tutti i tipi di inquinanti organici e inorganici.

L'inquinamento delle acque sotterranee costituisce un problema importante e complesso per le conseguenze sull'approvvigionamento idrico.

La contaminazione delle acque sotterranee avviene soprattutto attraverso la percolazione nel suolo di contaminanti che derivano dall'agricoltura (fertilizzanti e pesticidi), dalle discariche poco funzionanti, o da siti industriali dimessi. I solventi organoalogenati alifatici (tricloroetilene, tetracloroetilene, etc...) rappresentano i principali contaminanti da fonti puntuali delle falde acquifere. Questo è dovuto alla loro elevatissi-

ma produzione, al loro diffuso impiego in molte attività, alla loro stabilità chimica e biologica e alla loro scarsa tendenza ad essere adsorbiti dal suolo (Rapporti APAT, 23/2002).

I corpi idrici sotterranei e quelli superficiali possono inoltre essere interessati dalla contaminazione da pesticidi. Questa dipende da una serie di fattori quali le dosi e la natura dei pesticidi applicati (ad esempio la resistenza ai processi di degradazione e dissipazione), le caratteristiche pedologiche dei suoli e idrogeologiche dell'area, le condizioni meteorologiche e ambientali e il tipo di pratica agricola utilizzata. Un suolo permeabile (con alto contenuto in sabbia e basso contenuto in materia organica), un'elevata quantità di acqua di filtrazione o un elevato livello della falda acquifera favorendo la percolazione dei composti possono inquinare le risorse idropotabili.

I pesticidi applicati ad un suolo possono inoltre contaminare i corpi idrici superficiali attraverso l'acqua di dilavamento o con i sedimenti rimossi per erosione.

L'applicazione di quantità massicce di fertilizzanti nelle pratiche agricole è poi causa di contaminazione da nitrati che sono la forma finale del processo di ossidazione biologica dei composti azotati. Questo processo risulta favorito in suoli ben areati e, in associazione con un'elevata permeabilità, facilita il trasporto dei nitrati verso le falde acquifere (AEA, 2003).

Importanti per le acque sono inoltre l'inquinamento termico, provocato dagli scarichi a temperature elevate delle centrali termoelettriche e l'inquinamento dovuto al trasporto atmosferico attraverso le precipitazioni (piogge, neve, particolato).

Per quanto riguarda gli ecosistemi marini, essi risentono in maniera diretta o indiretta di tutte le attività antropiche, per cui possono risultare contaminati da ogni tipologia di inquinante. Per esempio, l'ambiente marino costiero, caratterizzato da acque con bassa densità batterica, pH leggermente alcalino, elevata salinità e bassa temperatura, presenta tempi lunghi di degradazione delle sostanze chimiche che vengono immesse attraverso i fiumi o il trasporto atmosferico. Queste zone possono quindi presentare un numero particolarmente elevato di contaminanti chimici, spesso a concentrazioni bassissime, non rilevabili con i metodi di routine (Rapporto APAT 23/2002). Un problema preoccupante è inoltre rappresentato dall'inquinamento da petrolio. Nelle acque oceaniche vengono immessi, annualmente, da due a cinque milioni di tonnellate di petrolio, di cui almeno la metà proviene da fonti che si trovano sulla terraferma, ad esempio rifiuti delle raffinerie e scarichi delle stazioni di servizio. Le navi diffondono il petrolio nei bacini in tre modi: per sversamento accidentale; durante le operazioni di carico e scarico; e durante le operazioni di discarica deliberata (pompaggio dell'acqua di sentina, scarico di zavorra dalle navi cisterna e pulitura delle cisterne delle petroliere) (Bascom, 1988).

Nei mari europei, sebbene risultino diminuiti gli scarichi di petrolio dalle raffinerie e dalle piattaforme in mare aperto, si verificano ancora gravi sversamenti accidentali. Se si considera che la produzione, il consumo e l'importazione di petrolio sono in costante aumento, anche il rischio di sversamenti aumenta (AEA, 2003).

Di fronte alla complessa problematica posta dall'inquinamento degli ambienti acquatici, a livello europeo viene perseguita una strategia identificabile soprattutto con la Direttiva Quadro 2000/60/CE del 23 ottobre 2000 in materia di tutela delle acque, che prevede la riduzione e la graduale eliminazione dell'inquinamento provocato da scarichi, emissioni e perdite di "singoli inquinanti o gruppi di inquinanti che presentano un rischio significativo per l'ambiente o attraverso di esso, compresi i rischi per le acque utilizzate per la produzione di acqua potabile".

La Direttiva in questione introduce un concetto molto importante: quello di "stato ecologico". Lo stato ecologico esprime la qualità della struttura e del funzionamento degli ecosistemi acquatici. Nella Direttiva sono indicati tre gruppi di elementi qualitativi (biologici, idromorfologici e fisico-chimici) che classificano lo stato ecologico di un corpo idrico. Sebbene al momento non sia possibile ottenere una rassegna completa dello stato ecologico delle acque in Europa, perché ci sono molte differenze nei sistemi di monitoraggio e valutazione dei vari Paesi, tutta la Commissione europea e gli Stati membri stanno collaborando al fine di eliminare queste differenze per raggiungere un'intesa comune su ciò che è necessario ai sensi della Direttiva quadro sulle acque.

Un altro elemento fondamentale della strategia descritta nella Direttiva è rappresentato dall'individuazione delle sostanze prioritarie (P) che sono definite come sostanze che presentano un rischio significativo per o attraverso l'ambiente acquatico. Tra le sostanze prioritarie sono poi identificate alcune di esse come sostanze pericolose prioritarie (PP), ovvero sostanze che hanno inoltre la caratteristica di persistenza e bioaccumulabilità.

Nella tabella 1 è riportato l'elenco delle 33 sostanze prioritarie indicate dalla Direttiva europea 2000/60/CE nell'allegato X.

Nel nostro ordinamento le sostanze pericolose ai fini della tutela delle acque superficiali dall'inquinamento sono quelle elencate nelle tabelle 3/A e 5 dell'Allegato 5 al Decreto Legislativo 11 maggio 1999 n. 152 e successive modifiche.

Solo per alcuni inquinanti esistono studi approfonditi di tipo tossicologico ed ecotossicologico e spesso su moltissimi composti chimici ad alto volume di produzione mancano informazioni sulla cancerogenicità, teratogenicità e genotossicità in vivo.

Tab. 1 - Elenco delle 33 sostanze prioritarie indicate dalla Direttiva europea 2000/60/CE nell'allegato X.

	Numero CAS (1)	Numero UE (2)	Denominazione della sostanza prioritaria	Identificata come sostanza pericolosa prioritaria
(1)	15972-60-8	240-110-8	Alaclor	
(2)	120-12-7	204-371-1	Antracene	(X) (***)
(3)	1912-24-9	217-617-8	Atrazina	(X) (***)
(4)	71-43-2	200-753-7	Benzene	
(5)	non applicabile	non applicabile	Difenileteri bromati (**)	X (****)
(6)	7440-43-9	231-152-8	Cadmio e composti	X
(7)	85535-84-8	287-476-5	C ₁₀₋₁₃ cloroalcani (**)	X
(8)	470-90-6	207-432-0	Clorfenvinfos	
(9)	2921-88-2	220-864-4	Clorpirifos	(X) (***)
(10)	107-06-2	203-458-1	1,2-Dicloroetano	
(11)	75-09-2	200-838-9	Diclorometano	
(12)	117-81-7	204-211-0	Ftalato di bis(2-etilesile) (DEHP)	(X) (***)
(13)	330-54-1	206-354-4	Diuron	(X) (***)
(14)	115-29-7	204-079-4	Endosulfan	(X) (***)
	959-98-8	non applicabile	(alpha-endosulfan)	
(15)	206-44-0	205-912-4	Fluorantene (****)	
(16)	118-74-1	204-273-9	Esaclorobenzene	X
(17)	87-68-3	201-765-5	Esaclorobutadiene	X
(18)	608-73-1	210-158-9	Esaclorocicloesano	X
	58-89-9	200-401-2	(gamma-isomero, lindano)	
(19)	34123-59-6	251-835-4	Isoproturon	(X) (***)
(20)	7439-92-1	231-100-4	Piombo e composti	(X) (***)
(21)	7439-97-6	231-106-7	Mercurio e composti	X
(22)	91-20-3	202-049-5	Naftalene	(X) (***)
(23)	7440-02-0	231-111-4	Nichel e composti	
(24)	25154-52-3	246-672-0	Nonilfenoli	X
	104-40-5	203-199-4	(4-(para)-nonilfenolo	
(25)	1806-26-4	217-302-5	Octilfenoli	(X) (***)
	140-66-9	non applicabile	(para-terz-octilfenolo)	
(26)	608-93-5	210-172-5	Pentachlorobenzene	X
(27)	87-86-5	201-778-6	Pentaclorofenolo	(X) (***)
(28)	non applicabile	non applicabile	Idrocarburi policiclici aromatici	X
	50-32-8	200-028-5	(Benzo(a)pirene)	
	205-99-2	205-911-9	(Benzo(b)fluoroantene),	
	191-24-2	205-883-8	(Benzo(g,h,i)perilene),	
	207-08-9	205-916-6	(Benzo(k)fluoroantene),	
	193-39-5	205-893-2	(Indeno(1,2,3-cd)pirene)	

segue Tab. 1 - Elenco delle 33 sostanze prioritarie indicate dalla Direttiva europea 2000/60/CE nell'allegato X.

	Numero CAS (1)	Numero UE (2)	Denominazione della sostanza prioritaria	Identificata come sostanza pericolosa prioritaria
(23)	7440-02-0	231-111-4	Nichel e composti	
(24)	25154-52-3	246-672-0	Nonilfenoli	X
	104-40-5	203-199-4	(4-(para)-nonilfenolo	
(25)	1806-26-4	217-302-5	Octilfenoli	(X) (***)
	140-66-9	non applicabile	(para-terz-octilfenolo)	
(26)	608-93-5	210-172-5	Pentachlorobenzene	X
(27)	87-86-5	201-778-6	Pentaclorofenolo	(X) (***)
(28)	non applicabile	non applicabile	Idrocarburi policiclici aromatici	X
	50-32-8	200-028-5	(Benzo(a)pirene)	
	205-99-2	205-911-9	(Benzo(b)fluoroantene),	
	191-24-2	205-883-8	(Benzo(g,h,i)perilene),	
	207-08-9	205-916-6	(Benzo(k)fluoroantene),	
	193-39-5	205-893-2	(Indeno(1,2,3-cd)pirene)	
(29)	122-34-9	204-535-2	Simazina	(X) (***)
(30)	688-73-3	211-704-4	Composti del tributilstagno	X
	36643-28-4	non applicabile	(Tributilstagno-catione)	
(31)	12002-48-1	234-413-4	Triclorobenzeni	(X) (***)
	120-82-1	204-428-0	(1,2,4-triclorobenzene)	
(32)	67-66-3	200-663-8	Triclorometano (Cloroformio)	
(33)	1582-09-8	216-428-8	Trifluralin	(X) (***)
(*) Quando si sono selezionati gruppi di sostanze, (tra parentesi e senza numero) sono indicate le singole sostanze tipiche rappresentative sotto forma di parametri indicativi. I controlli saranno diretti a tali singole sostanze, senza pregiudicare per questo l'inserimento di altre sostanze rappresentative, ove fosse necessario.				
(**) Questi gruppi di sostanze in genere comprendono un numero consistente di singoli composti. Allo stato attuale non è possibile fornire parametri indicativi appropriati.				
(***) Questa sostanza prioritaria è soggetta ad un riesame per l'eventuale identificazione come "sostanza pericolosa prioritaria". La Commissione presenta una proposta di classificazione definitiva al Parlamento europeo e al Consiglio entro 12 mesi dall'adozione dell'elenco. Tale riesame non inficia il calendario per la presentazione delle proposte della Commissione sui controlli di cui all'articolo 16 della direttiva 2000/60/CE.				
(****) Solo ossido di difenile, derivato pentabromato (numero CAS 32534-81-9).				
CAS: Chemical Abstract Services.				
Numero UE, ovvero Inventario europeo delle sostanze chimiche esistenti a carattere commerciale (EINECS) o Lista europea delle sostanze chimiche notificate (ELINCS)."				

3. ESPOSIZIONE DEGLI ORGANISMI ED EFFETTI BIOLOGICI

Gli inquinanti sono presenti nelle acque superficiali in forma disciolta e/o in sospensione. Le sospensioni possono essere costituite da goccioline oppure da particelle solide e gli inquinanti possono essere costituenti delle sospensioni o essere adsorbiti sulle particelle. In tutte queste forme, vengono trasportati dall'acqua anche a considerevoli distanze. Quando il materiale particellato ha una densità superiore al mezzo acquoso e la velocità di trasporto non è sufficiente a tenerlo in sospensione, tende ad essere sedimentato (deposto sul fondo).

I contaminanti presenti in soluzione e quelli associati ai colloidali (aggregati molecolari aventi dimensione media di 0,2-0,002 μm) e al seston (particolato in sospensione costituito da microalghe, larve, rispettive deiezioni, e aggregati batterici) costituiscono la frazione disponibile per gli organismi della colonna d'acqua, mentre i sedimenti sono la principale fonte di esposizione per quelli che vivono e si alimentano sul fondale. L'interfaccia aria/acqua rappresenta un compartimento particolare dove alcuni inquinanti si concentrano maggiormente, anche 100 volte più rispetto alla colonna d'acqua, rappresentando un rischio per plancton e stadi larvali di molte specie.

Il destino ambientale di un inquinante è dettato in primo luogo dalle sue proprietà chimico-fisiche, quali: reattività chimica, solubilità e volatilità. Queste determinano la sua ripartizione tra particellato sospeso e fase acquosa e tra questa e l'atmosfera, e ne influenzano la persistenza, la biodisponibilità e la biotrasformazione.

Anche altri fenomeni quali la fotoossidazione o la metilazione da parte dei microrganismi possono modificare la **biodisponibilità** degli inquinanti e interferire con la loro assunzione, mentre la diminuzione dello strato di ozono può aggravare gli effetti delle radiazioni ultraviolette e di altri mutageni fotoattivabili a carico di organismi che vivono negli strati d'acqua più superficiali.

La **bioconcentrazione** degli inquinanti, cioè il processo tramite il quale si ha accumulo di sostanze chimiche direttamente dall'acqua negli organismi acquatici (attraverso le branchie e il tessuto epiteliale) come anche il **bioaccumulo**, ovvero l'accumulo di sostanze nei tessuti degli organismi attraverso le diverse vie di esposizione, sono fenomeni complessi che dipendono dal tipo di specie e dal suo metabolismo oltre che dalle caratteristiche chimiche dell'inquinante stesso. In genere, gli animali acquatici assumono le sostanze, inquinanti e non, attraverso le branchie, il tubo digerente e la cute. Alcuni composti che presentano un elevato coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua, come ad esempio i policlorobifenili (PCB) o il DDT, attraversano più facilmente le membrane cellulari, mostrando una ripartizione preferenziale nei lipidi. In questo modo si accumulano nei tessuti fino a 10^4 - 10^5 volte rispetto alla colonna d'acqua. Per esempio è stato osservato che un pesce della famiglia degli scienidi (*Leiostomus xanthurus*) il quale quando viene messo in acqua contiene solo 1 parte per miliardo di PCB, mostra un accumulo di 3500 volte dopo 3 giorni e di 37000 volte dopo 1 mese (Suzuki, 1988). L'esistenza di relazioni trofiche tra organismi può determinare inoltre fenomeni di **bio-**

magnificazione, cioè un aumento di concentrazione dell'inquinante da un livello della catena alimentare al livello superiore. È ancora il caso dei PCB il cui più alto grado di accumulo si riscontra nelle foche, negli uccelli acquatici e anche negli uccelli predatori (aquile e falchi) perché predatori dei pesci e quindi legati tra loro nella catena alimentare.

Un concetto importante legato alla biomagnificazione è il trasferimento trofico, ovvero il movimento di contaminanti da un livello trofico, preda, ad un altro, predatore. La capacità di trasferimento trofico per una determinata sostanza viene misurata dal coefficiente di trasferimento trofico (TTC) dato dal rapporto tra le sue concentrazioni nei tessuti del predatore e della preda. Si ha biomagnificazione quando il TTC è superiore a 1; mentre TTC inferiori a 1 indicano sostanze che non biomagnificano, ma che possono bioaccumulare (APAT Rapporti 23/2002).

Poiché gli inquinanti persistenti entrano facilmente nelle catene alimentari, va poi ricordato anche il trasporto a lunga distanza legato alla migrazione degli animali (pesci, balene, uccelli) che, percorrendo migliaia di chilometri, determinano uno spostamento di massa degli inquinanti tra un ecosistema e l'altro. Si spiega così il livello particolarmente elevato di DDT e PCB in specie abitanti l'Artide o l'Antartide.

Gli effetti biologici di un'esposizione, dal livello molecolare a quello ecosistemico, sono difficilmente riconducibili all'agente inducente a causa delle modalità di esposizione, spesso multiple e ricorrenti, dell'induzione di risposte metaboliche comuni da parte di sostanze differenti, e della complessità dell'organizzazione biologica.

Nella tabella 2, costruita da Bolognesi e Venier (2003), sono riportati gli effetti indotti da composti tossici e genotossici ai vari livelli di organizzazione biologica.

I composti genotossici, mutageni e/o cancerogeni, al contrario degli altri agenti tossici, inducono modificazioni stabili dell'informazione genetica, ereditabili sia a livello cellulare che a livello di generazione, i cui effetti possono manifestarsi anche molto tempo dopo la fine dell'esposizione (come nel caso dei tumori o dell'espressione fenotipica delle mutazioni recessive). Inoltre, un danno genetico, significativo dal punto di vista biologico, può derivare anche da esposizioni a dosi non rilevabili con i saggi tossicologici tradizionali.

Nelle popolazioni naturali di animali acquatici, soprattutto pesci bentonici e molluschi, è stata rilevata un'elevata incidenza di tumori associati all'esposizione a sostanze inquinanti. I composti chimici direttamente correlati a questi effetti sono risultati gli IPA, i PCB, il DDT che sono stati ritrovati in elevate concentrazioni nei tessuti degli animali affetti da tumore. Uno studio realizzato sulla costa nord-occidentale degli Stati Uniti mediante una rete di stazioni di campionamento ha permesso di dimostrare, in alcune specie di pleuronectidi, l'esistenza di una correlazione positiva tra l'incidenza di neoplasie epatiche e i livelli di IPA misurati nei sedimenti, nell'acqua e negli stessi pesci. L'esposizione acuta o cronica ad inquinanti può alterare la struttura delle popolazioni e delle comunità di un ecosistema con possibilità di impoverimento genetico e di estinzione.

Tuttavia nei sistemi biologici complessi è difficile distinguere effetti genotossici, conseguenti ad un'esposizione, da effetti tossici di altra natura indotti dagli stessi o da altri agenti, perché essi agiscono più in generale diminuendo la vitalità, la salute e il successo riproduttivo degli individui.

L'esposizione ai composti genotossici non è di per sé letale per gli organismi, tuttavia si possono innescare meccanismi di selezione che con il tempo portano alla riduzione della probabilità di riproduzione dei genotipi più sensibili, confermando quelli con maggiore resistenza e valore adattativo alle condizioni ambientali. In ambienti cronicamente contaminati questo fenomeno a lungo andare provoca la perdita della diversità genetica.

Tab. 2 - Effetti biologici, dal livello molecolare e quello ecosistemico, indotti da composti tossici e genotossici

Livello Organizzativo	Risposte biologiche indotte	Tempo di latenza	Biomarcatori
Cellula	Segnali immediati di allarme Assorbimento, distribuzione e metabolismo - Alterazione di macromolecole biologiche (DNA e proteine) e di funzioni cellulari - Alterata espressione genica - Alterata proliferazione e differenziamento cellulari	Secondi/minuti Ore Ore/giorni	Reazioni comportamentali (alterazione nella reattività agli stimoli) Determinazione dei contaminanti e dei loro metaboliti nei liquidi biologici Danno al DNA, mutazioni, apoptosi, danno lisosomiale, alternata fagocitosi, accumulo di lipofuscine Attività enzimatiche di fase I e II, metallothioneine, heat shock protein, etc...
Tessuto/organo	Interferenza con i processi di detossificazione, regolazione ed alterazioni funzionali	Giorni/settimane	Lesioni preneoplastiche Alterazioni riproduttive
Organismo	Alterazioni di sviluppo, crescita, riproduzione, comportamento, tempo di vita	Mesi/anni	Difetti funzionali Riduzione della vitalità Riduzione della fertilità Malformazioni Tumori e altre patologie
Popolazione	Modificazione delle caratteristiche di popolazione nella sua struttura (abbondanza e distribuzione, composizione per età) e nella sua funzionalità (adattabilità, resistenza, probabilità di sopravvivenza e di riproduzione)	Anni	Dimensione e composizione Dominanza di varianti
Ecosistema	Cambiamenti strutturali e funzionali (biomassa, produttività, relazioni trofiche, etc...)	Anni	Varietà e abbondanza delle specie rappresentate nella comunità biologica
Fonte "Bolognesi C. e Venier P., Monitoraggio della genotossicità in matrici ambientali: acqua" In Mutagenesi Ambientale, 2003, Zanichelli, pp. 263-280			

Sono state riportate alte incidenze di tumori, soprattutto leucemie e germinomi, nei molluschi bivalvi di un'area costiera contaminata da pesticidi nello stato del Maine negli Stati Uniti. L'associazione osservata tra il livello elevato di germinomi in queste specie e l'aumento di tumori delle gonadi negli abitanti della stessa area geografica, suggerisce, ad esempio, per i molluschi marini il ruolo di bioindicatori predittivi di rischio per la salute umana (Bolognesi e Venier, 2003).

L'induzione di mutazioni nelle cellule germinali, negli organismi pluricellulari a riproduzione sessuata, può causare una diminuzione della popolazione, una variazione della composizione per età e in generale un aumento del carico mutazionale (mutazioni deleterie complessivamente presenti nei geni di una popolazione). Infatti nuove mutazioni difficilmente risultano vantaggiose e a volte possono ridurre l'efficienza riproduttiva di una popolazione.

In genere gli stadi embrionali, larvali e giovanili di molte specie acquatiche, che vivono negli strati più superficiali delle acque, risultano più sensibili agli inquinanti a causa dell'elevato tasso proliferativo di molte delle loro cellule e dei delicati processi di determinazione funzionale che avvengono durante lo sviluppo.

3.1 Gli animali acquatici come bioindicatori

Per **bioindicatori** si intendono tutti quei sistemi biologici (o parti di essi) che, mediante reazioni identificabili del loro stato (dal punto di vista biochimico, fisiologico, morfologico, ecologico, etc) rappresentano una risposta ad una situazione di "stress" e forniscono informazioni sulla qualità dell'ambiente.

Il bioindicatore può essere quindi definito come la specie "monitor" o "sentinella" di un contesto ambientale del quale si intende conoscere lo stato di salute, sia in tempo reale che nelle sue evoluzioni dinamiche. (Leonzio et al., 2003).

In generale l'organismo indicatore deve essere rappresentativo per ruolo ecologico, di facile reperibilità e mantenimento, informativo per l'area di campionamento e il più possibile conosciuto sotto il profilo genetico e funzionale per consentire la messa a punto e la validazione di indici utilizzabili nelle analisi ambientali.

Pesci, molluschi e crostacei sono gli organismi più utilizzati sia nel monitoraggio chimico della contaminazione dei corpi idrici sia per lo studio degli effetti biologici indotti.

4. ANALISI DEGLI EFFETTI GENOTOSSICI NEGLI ORGANISMI ACQUATICI

Per la valutazione degli effetti biologici di agenti genotossici in organismi acquatici viene utilizzato un approccio di biomonitoraggio simile a quello impiegato per le popolazioni umane e che consiste nella individuazione di biomarcatori di esposizione, di effetto e di suscettibilità.

Un biomarcatore rappresenta “la misura di una variazione indotta da un composto tossico o da altro fattore di stress in componenti o processi biochimici, cellulari, strutturali o funzionali, valutabile in un sistema biologico e rilevante per il problema studiato” (Bolognesi e Venier, 2003). Un biomarcatore deve essere sensibile, misurabile con precisione e utilizzabile su specie differenti. Inoltre, il tempo di comparsa dell’effetto misurato, che può variare da pochi minuti a settimane dall’esposizione, deve comunque essere breve per avere un significato predittivo.

I **biomarcatori di esposizione** indicano un’esposizione dell’organismo a dei composti chimici, senza fornire informazioni in merito all’intensità dell’effetto prodotto.

I **biomarcatori di effetto**, chiamati anche biomarcatori di risposta, sono invece la conseguenza dell’esposizione e possono spaziare da alterazioni a livello di un bersaglio critico fino a cambiamenti tardivi, progressivi ed effetti patologici importanti.

I **biomarcatori di suscettibilità** sono impiegati per identificare organismi con maggior probabilità di un effetto avverso a causa della variabilità individuale.

Dal punto di vista applicativo i biomarcatori vengono anche distinti, sulla base del tempo di risposta dell’organismo, in:

- precoci, (ore e giorni, a livello molecolare)
- tardivi, (settimane, mesi o anni, a livello cellulare o fisiologico)

Inoltre l’utilizzo dei biomarcatori è diverso a seconda che l’analisi sia di tipo distruttivo, preveda cioè il sacrificio degli animali, o non distruttivo perché vengono utilizzati sangue, penne, feci, pelle. Solo in questo secondo caso si ha il vantaggio di poter ripetere le determinazioni sullo stesso organismo a distanza di tempo.

Sebbene sia noto da tempo che il mantenimento dell’integrità strutturale e funzionale della molecola del DNA è requisito fondamentale per tutti gli esseri viventi, ad oggi pochissimi studi hanno affrontato il problema della riparazione del DNA negli organismi acquatici esposti ai contaminanti ambientali. I parametri di danno genetico maggiormente studiati sono: addotti al DNA, rotture della doppia elica, e danni cromosomici (sister chromatid exchange, SCE; micronuclei, MN; aberrazioni cromosomiche, AC). Tuttavia, nelle indagini ambientali delle acque solo alcuni di questi test vengono estesamente utilizzati.

L’applicazione di metodi biomolecolari sulle specie acquatiche per lo studio di mutazioni dei geni implicati nel controllo della replicazione cellulare e della stabilità genomica (p53, ras) o dell’attività trascrizionale di geni implicati nella risposta agli xenobiotici (ad esempio i geni di P450 o delle proteine indotte da stress) è stata avviata solo recentemente.

Nella tabella 3 sono elencati i principali biomarcatori di esposizione e di effetto per gli inquinanti genotossici nell'ambiente acquatico.

Tab. 3 - Biomarcatori di esposizione e di effetto per gli inquinanti genotossici

ORGANISMI	BIOMARCATORI DI ESPOSIZIONE	BIOMARCATORI DI EFFETTO
BATTERI E CELLULE IN COLTURA	1. DANNO E RIPARAZIONE DEL DNA <ul style="list-style-type: none"> ◦ Rotture della doppia elica ◦ Riparazione SOS 	1. MUTAZIONI PUNTIFORMI 2. DANNO CROMOSOMICO <ul style="list-style-type: none"> ◦ Aberrazioni cromosomiche ◦ Micronuclei
ORGANISMI NATIVI E STABULATI	1. DANNO AL DNA <ul style="list-style-type: none"> ◦ Danno ossidativo ◦ Rotture della doppia elica ◦ Addotti al DNA 	1. MUTAZIONI GENE-SPECIFICHE 2. DANNO CROMOSOMICO <ul style="list-style-type: none"> ◦ Aberrazioni cromosomiche ◦ Micronuclei

Di seguito vengono descritti i biomarcatori di esposizione e di effetto più utilizzati sugli organismi nativi e stabulati.

4.1 Addotti al DNA

Si definisce addotto al DNA qualsiasi entità chimica legata covalentemente alla molecola del DNA (Albertini et al., 2000).

Molti composti genotossici, sono in grado di legarsi covalentemente alle molecole nucleofile, DNA e proteine, presenti nelle cellule, formando dei complessi, a volte anche molto ingombranti, che non sempre sono stati del tutto caratterizzati chimicamente.

La relazione tra addotti, loro persistenza e riparazione e conseguenze a livello genico è molto complessa. Nella maggior parte dei casi le misure di addotti sono effettuate su DNA estratto da popolazioni cellulari eterogenee e si tratta di misure globali. Per quanto riguarda l'uomo, prove epidemiologiche mostrano che alcuni addotti al DNA sono predittivi di rischio tumorale; è il caso ad esempio dell'aflatossina B1 e cancro epatocellulare. Altri studi al contrario, sebbene mettano in risalto la correlazione positiva tra livello di addotti in un particolare tessuto o organo ed esposizione, non rilevano un ruolo predittivo degli addotti per lo sviluppo di tumori (Albertini et al., 2000). Negli organismi acquatici il tipo e l'ammontare di addotti al DNA dipende dall'esposizione e dal bioaccumulo, dall'efficienza delle trasformazioni metaboliche e dall'esistenza di meccanismi di riparazione delle lesioni indotte o di morte per apoptosi delle cellule gravemente danneggiate. Quindi, confrontando profili di addotti ottenuti da specie diverse in seguito ad esposizione allo stesso contaminante si notano marcate differenze quantitative e qualitative.

Un esempio è dato dal benzo(a)pirene, composto altamente mutageno e cancerogeno per molti tipi di organismi. Il benzo(a)pirene, idrofobico e di per sé chimicamente

inerte, in seguito ad attivazione metabolica forma composti DNA-reattivi che attaccano il DNA dando luogo sia ad addotti instabili, facilmente eliminati per depurinazione, sia ad addotti stabili la cui eliminazione dipende solo dall'intervento di meccanismi riparativi della cellula.

In generale la capacità di formare addotti al DNA è abbastanza limitata negli invertebrati rispetto agli organismi superiori. Tuttavia, la quantità effettiva di addotti dipende da tutti i fattori sopra menzionati. Ad esempio, un invertebrato come il mitilo è capace di accumulare decine e centinaia di microgrammi di benzo(a)pirene per grammo di tessuto, mentre nella trota iridea, si riscontrano concentrazioni tissutali di benzo(a)pirene inferiori di un ordine di grandezza rispetto al mitilo. Quando però si analizza la formazione di addotti negli stessi tessuti, sia del mitilo che della trota, si rileva una maggiore formazione di addotti nella trota proprio in ragione del diverso metabolismo dei due organismi che determina anche la formazione di intermedi DNA-reattivi completamente diversi.

Il metodo più comunemente utilizzato per misurare gli addotti al DNA nel biomonitoraggio dell'ambiente acquatico comporta l'estrazione del DNA (da sangue intero, linfociti periferici, tessuti), la sua digestione in nucleotidi, l'arricchimento, per digestione enzimatica o per estrazione in solvente organico, dei nucleotidi con gli addotti (rispetto ai nucleotidi normali), la loro marcatura con ^{32}P e la separazione per cromatografia bidimensionale su strato sottile. Tecniche autoradiografiche e scintillometriche consentono poi la stima quantitativa degli addotti nel campione.

Gli studi eseguiti su pesci e molluschi circa gli addotti al DNA che si formano in seguito ad esposizione ai composti aromatici indicano una rapida formazione dopo l'esposizione, il raggiungimento del livello massimo in pochi giorni o settimane e una lenta diminuzione con andamento bifasico. Nei pesci gli addotti possono raggiungere valori di decine di addotti ogni 10^8 nucleotidi normali (Bolognesi e Venier, 2003)

Il metodo di rilevazione e misura degli addotti al DNA è sensibile e, in taluni casi, predittivo per la formazione di mutazioni e tumori. Tuttavia la complessità della procedura e l'utilizzo di isotopi radioattivi ne limitano molto l'applicabilità nelle indagini ambientali.

4.2 Rotture al DNA: il test della cometa

Il test della cometa (Comet assay o anche Single Cell Gel Electrophoresis), dal momento della sua ultima modifica ad opera di Singh nel 1988 è stato applicato con successo su molti organismi acquatici spesso in parallelo ad altre misure di danno genetico.

Con questa tecnica, virtualmente, qualsiasi popolazione cellulare, proliferante e non, (leucociti, cellule renali, della mucosa orale, gastrica, nasale, cellule branchiali, cellule spermatiche) può essere analizzata per il danno al DNA. La scelta della tipologia cellulare migliore dipenderà dalle caratteristiche dell'esposizione, dalla specie, dal

tempo di campionamento, dall'accessibilità e dall'obiettivo dell'indagine. Il tipo di danno al DNA che viene rilevato con il test della cometa comprende: rotture e altre lesioni ossidative, siti labili agli alcali, e cross-links. Uno dei vantaggi enormi offerti da questa metodica risiede nel bassissimo quantitativo di cellule necessarie per l'analisi: ad esempio nel caso del sangue, un prelievo di 50 μ l è più che sufficiente.

La tecnica consiste nel sottoporre le cellule, sospese in un gel di agaroso e piastrate su un vetrino, a lisi con detergenti per liberare il DNA che può essere sottoposto ad elettroforesi (neutra o alcalina). Al termine, le cellule sono colorate con opportune sostanze fluorescenti. All'osservazione con microscopio a fluorescenza, le cellule non danneggiate si presenteranno con un nucleo tondeggianti e compatto, mentre le cellule danneggiate presenteranno una distensione più o meno accentuata del DNA con formazione di una struttura a "cometa" la cui coda è costituita da frammenti di DNA che sono migrati verso l'anodo e la cui testa risulta costituita dal resto del nucleo non danneggiato. L'intensità della coda è proporzionale al numero dei frammenti di DNA, mentre la sua lunghezza dipende dalla dimensione dei frammenti. Entrambi questi parametri sono valutati con un sistema computerizzato di analisi dell'immagine.

Il test della cometa si è dimostrato molto sensibile nelle specie acquatiche (1 rottura in 1×10^{10} Da), soprattutto pesci, dove mostra evidenti relazioni dose-effetto anche a concentrazioni molto basse di inquinanti genotossici (Mitchelmore and Chipman, 1998).

La valutazione del danno al DNA attraverso il test della cometa nelle specie ittiche viene frequentemente effettuata sugli eritrociti a causa della loro accessibilità e della possibilità di praticare il prelievo senza sacrificare gli animali. Più recentemente l'analisi sulle cellule del sangue è stata affiancata da quella su cellule epatiche e renali, perché più direttamente coinvolte nel metabolismo e nell'escrezione degli xenobiotici. In tutti e tre i tessuti si è evidenziato un aumento delle rotture al DNA all'aumentare della durata dell'esposizione agli inquinanti genotossici (Rajaguru P. et al., 2003)

Tuttavia, gli studi effettuati sulle specie ittiche hanno messo in luce la necessità di approfondimenti circa l'individuazione e il controllo dei fattori biologici e ambientali che possono influenzare i risultati ottenuti. In particolare, le influenze stagionali sui valori del controllo e le correlazioni spaziali e temporali relative ad aspetti specifici dell'ambiente studiato rappresentano le questioni da considerare più attentamente.

4.3 Danno cromosomico: aberrazioni cromosomiche e scambi tra cromatidi fratelli

Le aberrazioni cromosomiche strutturali risultano da rotture al DNA, da replicazione su uno stampo danneggiato, da inibizione della sintesi del DNA o da altri meccanismi. Solo le radiazioni ionizzanti e i composti radiomimetici (bleomicina) possono indurre aberrazioni in tutti gli stadi del ciclo cellulare: di tipo cromosomico se l'esposizione avviene nella fase G₀/G₁, e di tipo cromatidico se le cellule si trovano in fase S/G₂ e i cromosomi sono già replicati.

La maggioranza degli agenti chimici clastogeni induce quasi esclusivamente aberrazioni di tipo cromatidico, anche in cellule trattate nella fase G1 del ciclo cellulare. Questo effetto suggerisce che gran parte del danno al DNA da loro indotto non viene riparato prima della fase S e che le aberrazioni in realtà si formano proprio in seguito alla replicazione del DNA danneggiato. Le aberrazioni che vengono quindi indotte sono solo di tipo cromatidico e i composti che le inducono sono chiamati agenti S-dipendenti o con effetto ritardato. Questo comporta anche che la maggior parte degli agenti genotossici ai quali gli organismi viventi sono esposti indurrà essenzialmente aberrazioni di tipo cromatidico (Mosesso, 2003).

Sebbene vari test di valutazione del danno cromosomico siano stati applicati agli animali acquatici, questo tipo di analisi incontra ancora molte difficoltà. D'altra parte l'individuazione delle aberrazioni cromosomiche presuppone sia la disponibilità di cellule in replicazione o suscettibili di stimolazione in vitro, e sia una buona conoscenza del cariotipo della specie.

Nei pesci in particolare, la mancanza di informazioni sul cariotipo e, soprattutto, la presenza di un numero elevato e ampiamente variabile di piccoli cromosomi poco distinguibili morfologicamente limita in modo sostanziale l'utilizzo di questa analisi. Nella carpa comune, *Cyprinus carpio*, l'ammontare di DNA è pari ad 1/4 di quello dei mammiferi, tuttavia questa specie possiede ben 100 cromosomi (figura 1).



Fig. 1 - Piastra metafasica di *Cyprinus carpio*.

Fonte: Hamal Osmanodlu M., 2003, Karyotype analyses of the *Cyprinus carpio* (L., 1758) (carp) live in Mogan Lake (Ankara). G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi Cilt 23, Sayı 1: 1-10

Gli scambi tra cromatidi fratelli o, più semplicemente, SCE (Sister Chromatid Exchan-

ge), rappresentano lo scambio reciproco di DNA tra i loci omologhi di due cromatidi fratelli di un cromosoma replicato. Il significato biologico degli SCE è incerto: essi si verificano spontaneamente nelle cellule, ma la loro frequenza dipende dal tipo di organismo, dal tipo di tessuto, dal tipo di cellula e dalle condizioni sperimentali che vengono utilizzate.

Nelle cellule eucariotiche la frequenza di SCE aumenta in seguito ad esposizione ad agenti che inducono addotti e cross-links o che interferiscono con la replicazione del DNA. Agenti genotossici in grado di provocare solo rotture del DNA (raggi X, composti radiomimetici) non aumentano la frequenza degli SCE.

Il metodo di valutazione degli scambi prevede la replicazione del DNA in presenza di bromodeossiuridina per almeno due cicli cellulari consecutivi e l'analisi, dopo opportuna colorazione, delle metafasi al microscopio ottico.

Poiché la metodologia degli SCE richiede l'allestimento di preparati cromosomici, per le stesse ragioni viste sopra, il test ha trovato scarse applicazioni nelle specie acquatiche.

4.4 Il test del micronucleo

I micronuclei furono osservati per la prima volta più di un secolo fa nel citoplasma di eritrociti di mammiferi come piccole strutture rotondeggianti, colorate come il nucleo. Questi "frammenti di materiale nucleare" furono poi osservati anche in altri tipi cellulari come le cellule embrionali di ratto e di topo e gli apici radicali di *Vicia Faba* (Thoday, 1951) e chiamati "micronuclei". Evans nel 1959 effettuò il primo tentativo di conteggio dei micronuclei per misurare il danno indotto dai neutroni veloci e dai raggi gamma sugli apici radicali di *Vicia Faba*. Egli rilevò che le rotture cromatidiche e cromosomiche, come anche gli scambi simmetrici e asimmetrici, potevano dare origine ai frammenti acentrici e che quest'ultimi in alcuni casi erano espulsi dai nuclei delle cellule figlie, comparando nella successiva interfase, nel citoplasma come micronuclei. Tra il 1973 e il 1975 venne sviluppato il metodo definito appunto "micronucleus test" e consistente nel conteggio dei micronuclei in eritroblasti policromatici estratti dal midollo osseo dei mammiferi.

I primi studi sui linfociti umani risalgono al 1976 quando Countryman e Heddle dimostrarono che le radiazioni ionizzanti inducono micronuclei anche in questo tipo di cellula coltivata *in vitro*. Da questo momento sarebbero, tuttavia trascorsi undici anni prima di trovare un'applicazione efficiente del test. Infatti è del 1985, ad opera di Fenech e Morley, l'introduzione della metodologia del blocco della citochinesi (CBMN method) con citocalasina B (Fenech and Morley, 1985; Fenech, 1997a; Fenech, 1998; Bonassi et al., 2001; Fenech et al., 2003).

Il test, eseguito sui linfociti umani del sangue periferico, trova a questo punto ampia applicazione nei settori di ricerca appresso indicati:

– monitoraggio del danno genetico sulle popolazioni (Fenech et al., 1997b);

-
- valutazione del potenziale genotossico di agenti fisici e chimici (Lison et al., 2001; Crebelli et al., 2002; Touil et al., 2002; De Boeck et al., 2003);
 - valutazione di radiosensibilità dei tumori (Shibamoto Y et al., 1991);
 - misura della radiosensibilità individuale (Catena et al., 1996; 1997).

Il "CBMN method", di Fenech e Morley, permette di individuare i micronuclei nei linfociti che hanno completato una sola divisione nucleare e che sono identificabili mediante l'utilizzazione della citocalasina B (Cyt-B) che blocca la divisione citoplasmatica (citochinesi). La Cyt-B infatti, inibendo la formazione dell'anello di microfilamenti che separa il citoplasma tra i nuclei figli durante la citochinesi, permette l'accumulo di linfociti binucleati che hanno l'aspetto mostrato nella figura 2. Solo i micronuclei (figura 3) che si trovano nei linfociti binucleati sono conteggiati per le misure di genotossicità.

Questo metodo inizialmente sviluppato sui linfociti umani del sangue periferico, è stato esteso anche ad altri substrati cellulari come quelli derivanti da tumori solidi e dal midollo osseo.

Il test del micronucleo è stato applicato a una varietà di tipi cellulari e di specie appartenenti all'ambiente acquatico: pesci, anfibi, molluschi bivalvi e crostacei. I trattamenti con agenti genotossici hanno evidenziato anche in queste specie meccanismi di danno cromosomico comuni a quelli di organismi superiori.

A differenza dei metodi citogenetici precedentemente descritti, il test del micronucleo non implica l'allestimento di colture cellulari, è indipendente dal numero di cromosomi della specie, non presenta eccessive difficoltà di riconoscimento al microscopio ed è di facile e rapida esecuzione.



Fig. 2 - Linfocita binucleato e linfocita mononucleato

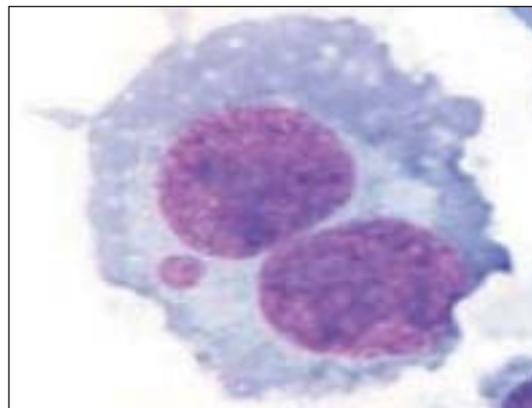


Fig. 3 - Linfocita binucleato contenente un micronucleo

Per queste ragioni rappresenta il test più estesamente utilizzato sulle specie acquatiche, ed è stato proposto come biomarcatore rapido e a basso costo della contaminazione da agenti genotossici in studi che utilizzano gli organismi acquatici come bioindicatori.

Nel presente rapporto verrà affrontata la tematica del micronucleo esclusivamente sulle specie ittiche.

5. IL TEST DEL MICRONUCLEO NELLE SPECIE ITTICHE

Nelle specie ittiche il test del micronucleo viene preferenzialmente effettuato sugli eritrociti del sangue periferico. Queste cellule (figura 4) infatti, sono molto numerose (da 20000 a 3000000/ml a seconda della specie) e conservano il nucleo anche negli stadi maturi.

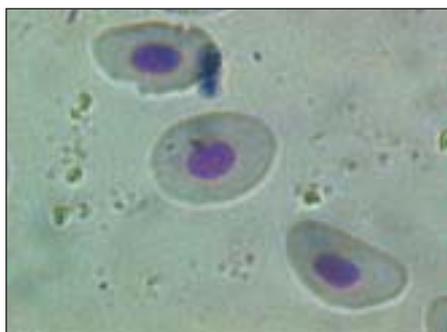


Fig. 4 - Eritrociti di *Dicentrarchus labrax* L. (spigola) colorati con Giemsa (ingrandimento 100X).

Numerosi studi hanno dimostrato che gli eritrociti del sangue periferico presentano un'elevata incidenza di micronuclei dopo esposizione a molti inquinanti ambientali. Nei pesci tuttavia, sono stati impiegati anche tessuti differenti, quali branchie, reni e fegato. Tra questi, le cellule isolate dalle branchie hanno mostrato una maggiore sensibilità agli effetti genotossici rispetto sia alle cellule renali che agli eritrociti del sangue periferico (Al-Sabti, 1995).

Nella tabella 4 sono riportati alcuni degli studi più significativi, effettuati su specie ittiche, sulla

valutazione di genotossicità di agenti fisici e chimici con il test del micronucleo.

I micronuclei sono nuclei di piccole dimensioni che si formano, come illustrato in figura 5, in seguito a:

- rotture cromatidiche o cromosomiche che generano frammenti acentrici;
- formazione di cromosomi con più centromeri (dicentrici, tricentrici, etc...);
- danni a carico della struttura del cinetocoro;
- danni a carico del fuso mitotico.

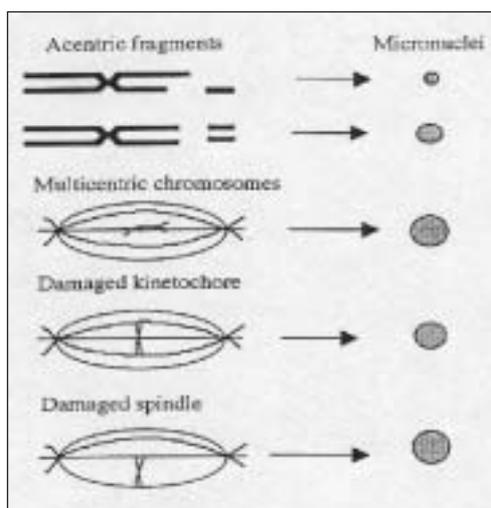


Fig. 5 - Meccanismi di formazione dei micronuclei

Tab. 4 - Test del micronucleo su specie ittiche per studi di genotossicità indotta da agenti fisici e chimici

Composti studiati	Specie	Tipo di cellula	FMN controllo (MN‰)	Riferimento bibliografico
Aflatossina B1, Aroclor 1254 (PCBs), Benzidine, Metilcolantrene	<i>Ctmopharyngodon idella</i>	eritrociti	6,8±1,6	Al-Sabti, 1986
	<i>Cyprinus carpio</i>	eritrociti	6,2±1,2	Al-Sabti, 1986
	<i>Tinca tinca</i>	eritrociti	6,5±1,4	Al-Sabti, 1986
Benzo(a)pirene	<i>Ictalurus nebulosus</i>	eritrociti	0,14	Metcalfe, 1988
	<i>Ctmopharyngodon idella</i>	eritrociti	6,8±1,6	Al-Sabti, 1986
	<i>Cyprinus carpio</i>	eritrociti	6,2±1,2	Al-Sabti, 1986
	<i>Tinca tinca</i>	eritrociti	6,5±1,4	Al-Sabti, 1986
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	eritrociti	-	Gravato and Santos, 2003a
	<i>Anguilla anguilla</i>	eritrociti	-	Maria et al., 2002
Cloruro di cadmio	<i>Oreochromis mossambicus</i>	branchie	10,0	Manna and Sadhukhan, 1986
		reni	8,0	Rodriguez-Cea et al., 2003
	<i>Salmo trutta</i>	reni	0,6±0,55	Rodriguez-Cea et al., 2003
	<i>Anguilla anguilla</i>	reni	0,38±0,52	Rodriguez-Cea et al., 2003
	<i>Phoxinus phoxinus</i>	reni	0,20±0,45	Ayllon and Garcia-Vazquez, 2000
	<i>Phoxinus phoxinus</i>	reni	0,58±0,79	Ayllon and Garcia-Vazquez, 2000
	<i>Poecilia latipinna</i>	reni	0,19±0,40	
Fenoli clorurati	<i>Canna punctatus</i>	eritrociti	0,72±0,43	Farah et al., 2003
Cromo VI e Cromo III	<i>Carassius auratus gibelio</i>	eritrociti	10,0±1,0	Al-Sabti et al., 1994
Dietil nitrosammina	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	fegato	0,0	William and Metcalfe, 1992
Miscele di Idrocarburi policiclici aromatici	<i>Genyonemus lineatus</i> + <i>Paralabrax clathratus</i>	eritrociti	0,8±1,1	Hose et al., 1987
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	eritrociti	-	Gravato and Santos, 2003b
	<i>Perca fluviatilis</i>	eritrociti	-	Al Sabti and Hardig, 1990
Idrocarburi policiclici aromatici: naftalene e β-naftoflavone	<i>Anguilla anguilla</i>	eritrociti	-	Teles et al., 2003
Etilmetansulfonato	<i>Ictalurus nebulosus</i>	eritrociti	0,14	Metcalfe, 1988
	<i>Umbra limi</i>	eritrociti	0,14	Metcalfe, 1988
	<i>Umbra pygmaea</i>	eritrociti	0,0	Hooftman and de Raat, 1982
	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	fegato	>1,0	Williams and Metcalfe, 1992
Metilmetansulfonato	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	reni	0,18±0,4	Ayllon et al., 2001
Mercurio (Hg²⁺) Selenio (SeIV)	<i>Carassius auratus gibelio</i>	eritrociti	5,2	Al-Sabti, 1994
Mercurio	<i>Cyprinus carpio</i>	eritrociti	0,40*	Nepomuceno et al., 1997
Metilmercurio	<i>Carassius auratus gibelio</i>	eritrociti	5,2	Al-Sabti, 1994
Nitrato di mercurio	<i>Phoxinus phoxinus</i>	reni	0,58±0,79	Ayllon and Garcia-Vazquez, 2000
	<i>Poecilia latipinna</i>	reni	0,19±0,40	Ayllon and Garcia-Vazquez, 2000
Cadmio e mercurio	<i>Anguilla anguilla</i>	reni	2,92	Sanchez-Galan et al., 2001

segue Tab. 4 - Test del micronucleo su specie ittiche per studi di genotossicità indotta da agenti fisici e chimici

Composti studiati	Specie	Tipo di cellula	FMN controllo (MN‰)	Riferimento bibliografico
Mitomicina C	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	fegato	>1,0	Williams and Metcalfe, 1992
	<i>Carassius auratus</i>	eritrociti	0,0	Ueda et al., 1992
	<i>Heteropneustes fossilis</i>	eritrociti	0,18±0,06	Das and Nanda, 1986
	<i>Clarias gariepinus</i>	eritrociti	-	Bahari et al., 1994
	<i>Tilapia rendalli</i>	branchie	0,4±0,3	Palhares and Grisolia, 2002
		reni	0,2±0,3	
	<i>Oreochromis niloticus</i>	branchie	0,2±0,3	Palhares and Grisolia, 2002
	reni	0,4±0,4		
	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	reni	0,18±0,4	Ayllon et al., 2001
Ciclofosfamide Colchicina	<i>Salmo trutta</i>	reni	0,6±0,55	Rodriguez-Cea et al., 2003
	<i>Anguilla anguilla</i>	reni	0,38±0,52	Rodriguez-Cea et al., 2003
	<i>Phoxinus phoxinus</i>	reni	0,20±0,45	Rodriguez-Cea et al., 2003
	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	reni	0,18±0,4	Ayllon et al., 2001
Insetticidi piretroidi sintetici (lambda- cyhalothrin)	<i>Garra Rufa</i>	eritrociti	3,0±0,58	Cavas and Gozuraka, 2003a
	<i>Cheirodon interruptus</i>	eritrociti	0,47*	Campana et al., 1999
	<i>interruptus</i>			
Raggi X	<i>Oreochromis mossambicus</i>	branchie	10,0	Manna and Sadhukan, 1986
		reni	8,0	
	<i>Clarias gariepinu</i>	eritrociti	-	Bahari et al., 1994
	<i>Onchorhynchus mykiss</i>	eritrociti	1,0	Schultz et al., 1993
Cesio -137	<i>Esox lucius</i>	eritrociti	5,3±1,1	Al-Sabti 1992
Scarichi industria tessile (9 gg di esposizione)	<i>Oreochromis niloticus</i>	eritrociti	1,58±0,17	Cavas and Gozuraka, 2003b
		branchie	1,84±0,22	
Clorotriazina Azo Red 120 (colorante industria tessile)	<i>Prussian carp</i>	eritrociti	4,7±0,6	Al-Sabti, 2000
Idrocarburi clorurati (DDT, PCB)	<i>Genyonemus</i>	eritrociti	0,8±1,1	Hose et al., 1987
	<i>lineatus+Paralabrax clathratus</i>			
	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	eritrociti	-	Longwell et al., 1983; Huges and Hebert, 1991
	<i>Genyonemus lineatus</i>	eritrociti	-	Carrasco et al., 1990
* È stato calcolato un valore medio tra tutte le frequenze di MN spontanei presentate ai vari tempi di esposizione				

Durante la telofase mitotica intorno ai frammenti e ai cromosomi "spiazzati" si costituisce un involucro nucleare e gradualmente queste formazioni assumono la morfologia del nucleo principale fatta eccezione per le dimensioni ridotte (figura 6). Poiché dunque i micronuclei costituiscono l'espressione di eventi di rottura e di perdita cromosomica, la loro quantificazione rappresenta un valido metodo di valutazione del danno al DNA a livello cromosomico.

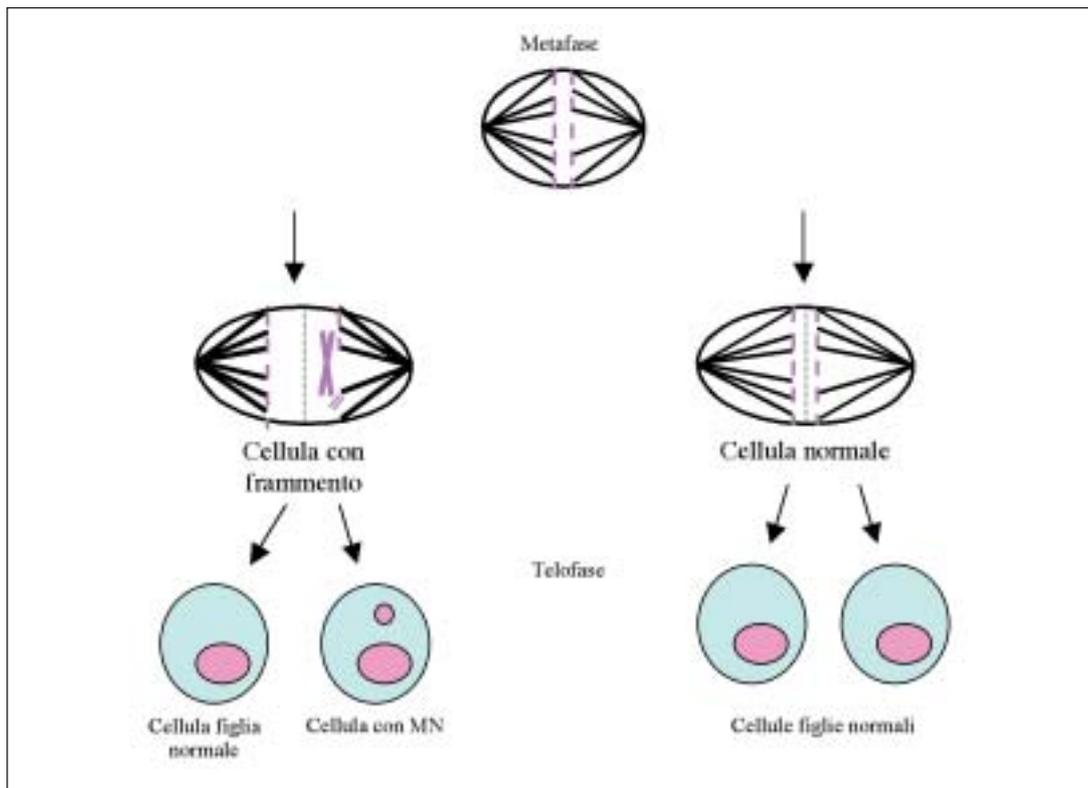


Fig. 6 - Meccanismo di formazione di una cellula con micronucleo

Le dimensioni dei micronuclei negli eritrociti dei pesci sono inferiori a quelle riscontrabili nei mammiferi, a causa della minore grandezza dei cromosomi. Al-Sabti (1995) riporta valori compresi tra 1/10 a 1/30 del nucleo principale.

L'analisi della frequenza dei micronuclei negli eritrociti può essere effettuata immediatamente al termine dell'esposizione su strisci di sangue periferico oppure dopo stimolazione in vitro (con fitoemoagglutinina) degli eritrociti e successivo blocco con Cyt-B come nel protocollo del "CBMN method" messo a punto sui linfociti umani. I tempi di incubazione e trattamento con la Cyt-B devono tuttavia essere stabiliti per ciascuna specie attraverso prove preliminari che definiscano in modo preciso le condizioni sperimentali.

I micronuclei diventano evidenti a distanza di un ciclo cellulare dalla loro formazione, quindi la loro frequenza in una popolazione cellulare dipende dal ritmo di proliferazione, molto variabile nelle diverse specie e nei diversi tessuti bersaglio, anche in funzione delle condizioni ambientali. I tempi di trattamento devono quindi essere standardizzati per ogni singola specie ogniqualvolta non siano note le condizioni di proliferazione (Bolognesi e Venier, 2003).

La persistenza dei micronuclei nelle cellule può variare da pochi giorni a tempi più lunghi in relazione alla capacità proliferativa delle cellule, ma non esistono studi si-

stematici a questo riguardo. È ipotizzabile che nelle esposizioni continue, come spesso sono quelle ambientali, si raggiunga un equilibrio tra formazione ed eliminazione dei micronuclei.

5.1 Studi di laboratorio

Gli studi di genotossicità con il test del micronucleo vengono effettuati utilizzando le specie ittiche stabulate esposte in laboratorio ai composti chimici da indagare per tempi di esposizione differenziati.

L'induzione dei micronuclei negli eritrociti di sangue periferico può dipendere da diversi fattori, come la specie utilizzata, il protocollo metodologico impiegato, le condizioni di mantenimento degli animali in corso di esperimento, e altro (Al-Sabti, 1995). Tuttavia a tutt'oggi non si conoscono studi approfonditi circa l'influenza delle diverse variabili sulla frequenza dei micronuclei ed i protocolli sperimentali utilizzati dai vari autori differiscono su numerosi aspetti.

Un esempio tra tutti è dato dal numero totale di eritrociti di sangue periferico che vengono contati al microscopio ottico per la ricerca dei micronuclei. Da una nostra indagine su una parte degli studi di genotossicità su specie ittiche che utilizzano questo substrato cellulare emerge che il numero di eritrociti osservati è molto variabile e va da un minimo di 1000 ad un massimo di 6000 per organismo (tabella 5).

Tab. 5 - Numero di eritrociti di sangue periferico contati al microscopio ottico per il test del micronucleo

Riferimento bibliografico	Numero di eritrociti/pesce
Russo et al., 2004	1000
Conti et al., 2004	2000
Cavas e Gozuraka, 2003	1500
Farah et al., 2003	1000-1200
Teles et al., 2003	1000
Pacheco e Santos, 2002	1000
Grisolia e Starling, 2001	3000
Al-Sabti, 2000	2000
Campana et al., 1999	1000
Nepomuceno et al., 1997	6000
Bahari et al., 1994	4000

Al fine di stabilire il numero minimo di eritrociti che deve essere osservato per il calcolo della frequenza dei micronuclei, abbiamo effettuato una serie di letture ripetute sui preparati eritrocitari di 3 campioni di *Dicentrarchus labrax*. I campioni scelti sono stati: un controllo negativo (trattamento A), un esposto ad un agente lievemente ge-

notossico (trattamento B), e un esposto ad un agente fortemente genotossico (trattamento C). Per ciascun trattamento (A, B e C) sono stati contati i micronuclei ogni 500 cellule per un totale di 8000 (B) e 10000 eritrociti (A e C) per tre volte. L'effetto genotossico indotto viene misurato come frequenza di micronuclei (FMN) ottenuta dal rapporto tra il numero totale dei micronuclei e il numero totale di eritrociti osservati. I risultati medi delle tre letture sono mostrati nella tabella 6.

Tab. 6 - Letture ripetute su eritrociti di *Dicentrarchus labrax* del controllo (A) e dopo esposizione a sostanze genotossiche (B ed C)

TRATTAMENTO A		TRATTAMENTO B		TRATTAMENTO C	
EN	FMN	EN	FMN	EN	FMN
500	0,0040	500	0,0080	500	0,0100
1000	0,0020	1000	0,0050	1000	0,0130
1500	0,0013	1500	0,0040	1500	0,0127
2000	0,0015	2000	0,0040	2000	0,0120
2500	0,0016	2500	0,0036	2500	0,0120
3000	0,0017	3000	0,0037	3000	0,0117
3500	0,0014	3500	0,0037	3500	0,0126
4000	0,0013	4000	0,0040	4000	0,0122
4500	0,0011	4500	0,0038	4500	0,0129
5000	0,0012	5000	0,0038	5000	0,0136
5500	0,0011	5500	0,0040	5500	0,0135
6000	0,0013	6000	0,0040	6000	0,0120
6500	0,0012	6500	0,0040	6500	0,0134
7000	0,0011	7000	0,0039	7000	0,0136
7500	0,0013	7500	0,0040	7500	0,0132
8000	0,0013	8000	0,0039	8000	0,0130
8500	0,0013			8500	0,0134
9000	0,0012			9000	0,0130
9500	0,0015			9500	0,0136
10000	0,0015			10000	0,0133

Abbreviazioni: EN: eritrociti normali; MN: micronuclei; FMN: Frequenza dei micronuclei (MN/EN).

Confrontando i valori delle FMN ottenute è risultato che il numero di eritrociti totali che devono essere analizzati per i micronuclei è pari a 2000 in tutti i trattamenti considerati.

Il conteggio di 1000 eritrociti non risulta infatti sufficiente, poiché la FMN ottenuta in questo caso risulta significativamente differente dalla FMN ottenuta su 2000 cellule ($p < 0,05$; t-test) per tutti i trattamenti.

La FMN ottenuta su 1500 eritrociti non è risultata significativamente differente dalla

FMN ottenuta su 2000 cellule per il trattamento A e B, ma nel trattamento C le due frequenze sono significativamente differenti ($p < 0,05$, t-test).

L'estensione del conteggio oltre i 2000 eritrociti non è risultata necessaria, infatti ad es. le FMN ottenute su 4000 cellule non risultano significativamente differenti dalla FMN ottenuta su 2000 cellule. Nella tabella 7 sono mostrate le FMN ottenute dopo tre serie (I, II, III) ripetute di conteggi di 1000, 2000, 4000 e 6000 eritrociti su 5 zone del vetrino del campione C.

Il confronto tra i valori dei coefficienti di variazione (CV) delle FMN mette in evidenza la maggiore variabilità esistente nei conteggi di 1000 eritrociti rispetto all'osservazione di numeri maggiori di cellule.

Tab. 7 - Frequenze dei MN ottenute dopo serie ripetute di conteggi di 1000, 2000, 4000 e 6000 cellule

Letture di 1000 cellule				Letture di 2000 cellule				Letture di 4000 cellule				Letture di 6000 cellule			
I	II	III		I	II	III		I	II	III		I	II	III	
0,0100	0,0070	0,0170		0,0115	0,0115	0,0125		0,0120	0,0128	0,0123		0,0118	0,0117	0,0122	
0,0140	0,0150	0,0140		0,0125	0,0130	0,0125		0,0115	0,0130	0,0125		0,0123	0,0118	0,0122	
0,0080	0,0120	0,0090		0,0115	0,0125	0,0115		0,0120	0,0125	0,0120		0,0118	0,0122	0,0120	
0,0110	0,0160	0,0170		0,0115	0,0125	0,0115		0,0123	0,0123	0,0115		0,0122	0,0122	0,0123	
0,0180	0,0100	0,0170		0,0125	0,0110	0,0130		0,0123	0,0120	0,0120		0,0120	0,0123	0,0117	
M	ST	STM	CV	M	ST	STM	CV	M	ST	STM	CV	M	ST	STM	CV
0,0130	0,004	0,001	28,19	0,0121	0,001	0,0002	5,40	0,0122	0,0004	0,0001	3,33	0,0120	0,0002	0,0001	1,92

Abbreviazioni: M: media; ST: scarto tipo; STM: scarto tipo della media; CV: coefficiente di variazione

Prove da noi eseguite in laboratorio hanno mostrato che il tempo medio di lettura di 2000 eritrociti da parte di un operatore esperto è pari a circa 30 minuti. Considerando che le valutazioni di genotossicità con il metodo considerato richiedono l'esame di un elevato numero di animali ed almeno 3 diverse concentrazioni di inquinante, spesso l'operatore ha il compito di analizzare al microscopio 100-120 vetrini/esperimento pari a 200000-2400000 eritrociti.

La lettura di 2000 cellule costituisce quindi un giusto compromesso tra fattibilità della conta e rappresentatività del risultato.

È ipotizzabile che questo numero possa essere applicato in generale a tutte le specie ittiche utilizzate nei test di genotossicità, tuttavia la conferma deve essere ottenuta, preliminarmente all'esecuzione della sperimentazione, attraverso letture ripetute da un minimo di 1000 ad un massimo di 6000 eritrociti.

Dagli studi presenti in letteratura risulta che il protocollo metodologico maggiormente utilizzato (Al-Sabti, 1995) nelle indagini di laboratorio consiste dei seguenti passaggi principali:

- acclimatazione dei pesci in laboratorio (per 14 giorni);

-
- esposizione al genotossico (per iniezione intraperitoneale o per immissione nell'acqua di allevamento);
 - prelievo del sangue (puntura vena caudale o puntura cardiaca);
 - strisci su vetrino;
 - fissazione dei vetrini in alcool etilico assoluto per 20';
 - asciugatura dei vetrini all'aria;
 - colorazione con Giemsa al 10% per 10 minuti.

Generalmente, almeno 3 concentrazioni di inquinante, 1 controllo e 1 controllo positivo (tossico di riferimento) sono previsti per ciascun esperimento per determinare una relazione dose-risposta. Per ciascun trattamento inoltre sono impiegati da 3 a 12 animali. I tempi di esposizione utilizzati sono: 3, 6 e 9 giorni.

Quando si deve indagare la genotossicità potenziale di una sostanza sconosciuta è indispensabile individuare preventivamente un intervallo di concentrazioni che non risulti letale per la specie utilizzata. A tal fine il Laboratorio Ittiologico di ARPA Ferrara in collaborazione con il Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT, ha messo a punto una procedura per la determinazione dei valori di NOEC (concentrazione di non-effetto) e LOEC (limite inferiore di concentrazione che dà effetti osservabili) con un saggio di tossicità cronica a 9 giorni. Brevemente, la procedura consiste nell'esecuzione preliminare di un test acuto di tossicità (96 ore) in cui gli organismi sono esposti alle concentrazioni di 1000 – 100 – 10 – 1 – 0,1 mg/L della sostanza da indagare. Al termine, sulla base delle percentuali di mortalità ottenute, si scelgono 5 concentrazioni scalari di sostanza da utilizzare nel test di tossicità a 9 giorni. Per ogni concentrazione sono esposti 10 branzini e l'esperimento è ripetuto tre volte. Al termine dei 9 giorni stabiliti per il saggio di tossicità cronica vengono annotate le percentuali di sopravvivenza.

I valori di NOEC e LOEC sono calcolati con il metodo statistico (US EPA, 1993) utilizzando il pacchetto software USEPA "ToxStat" che impiega il test di Dunnett.

All'interno dei valori di NOEC e LOEC vengono stabilite almeno 3 concentrazioni scalari di sostanza che potranno essere utilizzate per l'esecuzione del test del micronucleo.

5.2 Studi in situ

Negli studi di biomonitoraggio che hanno incluso la valutazione degli effetti genotossici, campioni di pesci vengono raccolti nei siti inquinati e confrontati con identici campioni prelevati da un'area di riferimento. È fondamentale il prelievo, dai vari siti, di un numero adeguato di animali (da 10 a 20) della stessa specie, delle stesse dimensioni e possibilmente della stessa età per comporre un campione sufficiente alla valutazione degli effetti di una contaminazione sulla base delle frequenze di micronuclei considerate separatamente per ogni individuo.

Differenze di esposizione e quindi di risposta agli insulti genotossici possono anche dipendere dagli spostamenti dei pesci, poiché anche specie stanziali che vivono in un territorio limitato, comunque si muovono in funzione della stagione o in risposta a determinati stimoli.

In alternativa, i pesci prelevati da un sito di riferimento o acquistati presso gli allevamenti, dopo un breve periodo di acclimatazione in laboratorio, sono posti in gabbie galleggianti che sono poi collocate nelle aree inquinate. A tempi prestabiliti e differenti di esposizione (ad esempio dopo 7, 15, e 30 giorni), un certo numero di animali viene portato in laboratorio e sacrificato per l'analisi citogenetica.

Questo tipo di studio condotto ad esempio sui fiumi dove è possibile posizionare le gabbie con i pesci a monte e a valle di un sito contaminato è di particolare utilità per stabilire la relazione tra l'esposizione ai contaminanti e la risposta clastogenica (Al-Sabti et al., 1994).

Il protocollo metodologico con le gabbie galleggianti consiste dei seguenti passaggi principali:

- acclimatazione dei pesci, catturati o di allevamento, in laboratorio (per 10-14 giorni);
- studio del sito contaminato e del posizionamento delle gabbie galleggianti;
- esposizione degli animali (da 10 a 20 animali per gabbia) nelle gabbie galleggianti allocate nel sito contaminato;
- gabbie di controllo poste in un sito di riferimento oppure organismi di controllo mantenuti in laboratorio (in vasche) o entrambi;
- a tempi prestabiliti di esposizione, trasporto di una frazione di animali in laboratorio;
- prelievo del sangue (puntura vena caudale o puntura cardiaca);
- strisci su vetrino;
- fissazione dei vetrini in alcool etilico assoluto per 20';
- asciugatura dei vetrini all'aria;
- colorazione con Giemsa al 10% per 10 minuti.

6. IL TEST DEL MICRONUCLEO IN ERITROCITI DI *DICENTRARCHUS LABRAX L.*

6.1 Introduzione

Nell'ambito della Convenzione APAT-ICRAM riguardante "Test chimici e tossicologici per i prodotti disperdenti e assorbenti impiegati nella bonifica degli ambienti marini dalla contaminazione con idrocarburi petroliferi" conseguente al Decreto Direttoriale 23 Dicembre 2002, l'APAT ha intrapreso uno studio riguardante la valutazione di genotossicità dei suddetti composti, da eseguire con il test del micronucleo, sugli eritrociti della specie ittica marina *Dicentrarchus labrax L.*

La scelta di questo teleosteo marino è nata da una serie di considerazioni:

- trattandosi di una specie autoctona, rispondeva alle richieste del Decreto;
- rappresenta una specie facile da allevare in laboratorio in condizioni controllate;
- la sua sensibilità nei saggi ecotossicologici a breve e lungo termine era già stata estesamente indagata presso il Laboratorio Ittiologico di ARPA Ferrara partecipante allo studio in merito al Decreto.
- il suo utilizzo come indicatore di genotossicità era stato dimostrato dagli studi di Gravato e Santos (2003a e 2003b).

La sperimentazione effettuata per lo studio della genotossicità dei prodotti disperdenti petroliferi ha offerto la possibilità di una messa a punto del test del micronucleo, con l'introduzione di modifiche rispetto al protocollo più comunemente presentato in letteratura (Al-Sabti, 1995).

In particolare, viene proposto un metodo alternativo allo striscio (metodo Cytospin) per l'allestimento dei preparati citologici da analizzare per i micronuclei che, a nostro parere, permette di stabilire e controllare la distribuzione cellulare sui vetrini, rendendo la lettura al microscopio più rapida, agevole e accurata.

Vengono inoltre proposti i criteri di riconoscimento e classificazione delle cellule al microscopio ottico, stabiliti allo scopo di uniformare le letture di differenti operatori all'interno del laboratorio e per l'avvio di studi collaborativi ai fini della convalida del metodo.

6.2 Scopo e campo di applicazione

L'analisi citogenetica di seguito descritta può essere utilizzata per la valutazione della genotossicità di inquinanti immessi negli ambienti acquatici.

Vengono analiticamente descritti e posti a confronto due metodi di esecuzione del test del micronucleo in eritrociti di sangue periferico, denominati:

- metodo dello striscio;
- metodo "Cytospin".

La specie ittica utilizzata per la messa a punto dei due metodi è *Dicentrarchus labrax L.*, comunemente chiamata branzino o spigola.

6.3 Principio

Gli animali, dopo opportuno periodo di acclimatazione in laboratorio, sono esposti all'agente genotossico da indagare per differenti tempi di esposizione. Al termine di ciascuna scadenza espositiva, viene prelevato il sangue periferico da ciascun individuo e preparati i vetrini. I preparati citologici colorati opportunamente, sono osservati al microscopio ottico e analizzati per il conteggio dei micronuclei. La genotossicità viene espressa come frequenza media di micronuclei (FMN) ottenuta rispetto al valore medio nei campioni di controllo mantenuti nelle stesse identiche condizioni sperimentali.

6.4 Definizioni

6.4.1 Frequenza dei micronuclei: Rapporto tra il numero totale dei micronuclei e il numero totale di eritrociti osservati

6.4.2 Frequenza delle anomalie nucleari: Rapporto tra il numero totale di anomalie nucleari e il numero totale di eritrociti osservati

6.4.3 Scarto tipo: Deviazione Standard

6.4.4 Scarto tipo della media: Rapporto tra lo scarto tipo e la radice quadrata del numero di osservazioni

6.4.5 Coefficiente di variazione percentuale: Rapporto tra lo scarto tipo e la media moltiplicato per 100

6.5 Organismi

Vengono utilizzati giovanili di *Dicentrarchus labrax L.* di lunghezza minima pari a 7-8 cm (figura 7).

Nella tabella 8 sono riportate la sistematica e le principali condizioni di mantenimento in laboratorio del branzino.



Fig. 7 - *Dicentrarchus labrax* L.

Tab. 8 - *Dicentrarchus labrax* L. (branzino o spigola)

Sistematica	<p>Classe: Osteitti Divisione: Teleostei Ordine: Perciformi Famiglia: Serranidae Genere: <i>Dicentrarchus</i> Specie: <i>Dicentrarchus labrax</i> L.; <i>Dicentrarchus punctatus</i>.</p>
Morfologia	<p>Lunghezza massima: 1 m. Peso: 12-14 Kg. Taglia più frequente compresa fra 30 e 60 cm. Corpo snello, slanciato, ricoperto di scaglie ctenoidi; scaglie cicloidi sono presenti sul capo nello spazio interorbitario. Fessura boccale profonda che raggiunge il margine anteriore dell'occhio. Denti piccoli a uncino sulle mascelle, sul vomere e sul palato. Opercolo con macchia scura e due robuste spine all'angolo supero-posteriore. Due pinne dorsali separate; Pinna caudale leggermente forcuta, peduncolo caudale molto alto e spesso. Linea laterale con 62-80 scaglie. Colorazione del corpo argentea, con dorso grigio verdastro e ventre bianco. Non c'è dimorfismo sessuale.</p>
Fasi di sviluppo	<ul style="list-style-type: none"> - Larva (3-5 mm) - Post-larva dopo (in media) 30 gg dalla schiusa - Giovanile dopo 50-60 gg dalla schiusa (animale con morfologia dell'adulto; da questo momento cresce solo in lunghezza) - Adulto dopo 2-3 anni dalla schiusa (animale che ha raggiunto la maturità sessuale)
Condizioni di mantenimento	<p><u>Acqua marina sintetica</u> Acqua bidistillata o deionizzata libera da sostanze organiche (Milli Q – Millipore) + 30-35‰ di sale marino artificiale <i>Instant Ocean</i> <u>Parametri chimico-fisici</u> Temperatura: 20° ± 1 °C Intensità della luce: 500-800 lux Fotoperiodo: 14 ore luce – 8 ore buio Concentrazione O₂: 6 mg/L pH: 7,5-8,5 nitrati: fino a max 80 mg/L</p>

6.6 Reagenti e soluzioni

1. Terreno di coltura per linfociti RPMI 1640 Dutch Modification (liquido, sterile e filtrato con 1 g/L di sodio bicarbonato e Hepes 20 mM; senza L-glutammina)
2. Soluzione di Penicillina/Streptomicina (5000 U.I./ml/5 mg/ml)
3. Sodio eparina (Sigma, salt from porcine intestinal mucosa 25,000 u)
4. Alcool metilico assoluto
5. Alcool etilico assoluto
6. Colorante per ematologia Giemsa
7. Xilene
8. Eukitt montante per vetrini

6.7 Strumentazione

Strumento	Operazione
Cappa biologica di sicurezza	Preparazione del terreno di mantenimento del sangue
Cappa chimica	Montaggio dei vetrini
Coulter counter	Conteggio degli eritrociti nelle sospensioni cellulari
Cytospin	Centrifugazione delle cellule direttamente su vetrino
Vortex	Risospensione dei campioni cellulari
Microscopio ottico	Analisi e conteggio dei micronuclei
Frigorifero (4°C)	Conservazione di reagenti, soluzioni e campioni biologici
Micropipettrici	Inoculi cellulari

6.8 Metodo dello striscio

6.8.1 Requisiti preliminari

Pulizia dei vetrini

Da effettuarsi qualche giorno prima dell'inizio della procedura. Utilizzare vetrini portaoggetto molati, smerigliati e forniti di banda sabbata per la siglatura.

- Immergere i vetrini occorrenti per l'esperimento in un barattolo di vetro contenente alcool etilico assoluto. Lasciare per 2-3 giorni.
- Trasferire i vetrini in una bacinella contenente acqua distillata e strofinarli uno per volta per eliminare eventuali residui di grasso. Controllare che su ciascun vetrino si formi un film continuo di acqua.
- Risciacquare i vetrini in acqua distillata e asciugarli con un panno di cotone. Riporre i vetrini in una scatola portavetrini fino al momento dell'uso.

6.8.2 Prelievo del sangue: puntura della vena caudale

- Aspirare con una siringa in plastica monouso sterile da 2,5 ml (23Gx1 1/4" 0,6x30 mm) 2 ml di eparina sodica e con lenti movimenti della siringa favorire la distribuzione della sostanza sulle pareti interne; quindi far defluire il liquido dalla siringa.
- Adagiare un branzino sul bancone da laboratorio immobilizzandolo su un fianco
- Inserire la siringa eparinata in corrispondenza del termine della prima pinna anale, penetrando sino alla colonna vertebrale (figura 8).
- Arretrare leggermente con l'ago e iniziare una lenta aspirazione sollevando progressivamente il pistone della siringa.



Fig. 8 - Puntura della vena caudale

6.8.3 Preparazione degli strisci

La quantità di sangue periferico prelevabile dalla vena caudale di giovanili di branzino di circa 8 cm è di solito compresa tra 0,2 e 0,4 ml. È stato provato sperimentalmente che 0,2 ml di sangue sono sufficienti ad ottenere 2 vetrini strisciati. Esperienze interne al laboratorio di metodologie citogenetiche del Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT e la letteratura scientifica del settore (Al-Sabti, 2000) consigliano la preparazione di almeno 2 vetrini strisciati per ciascun branzino. Procedere come segue:

-
- Depositare su un vetrino pulito e asciutto, posto in piano, una piccola goccia di sangue a circa 0,5 cm dalla banda sabbata (figura 9).
 - Prendere un secondo vetrino con il bordo molato e appoggiarlo centralmente sul vetrino posto in piano.
 - Far arretrare il secondo vetrino, con un'inclinazione di circa 45°, fino a toccare la goccia di sangue che si diffonderà rapidamente lungo la linea di contatto dei due vetrini.
 - Spostare il secondo vetrino rapidamente in avanti con movimento deciso e uniforme, mantenendo l'inclinazione, fino a distendere completamente la goccia di sangue sul vetrino posto in piano.
 - Far asciugare lo striscio all'aria per 24 h (figura 10).

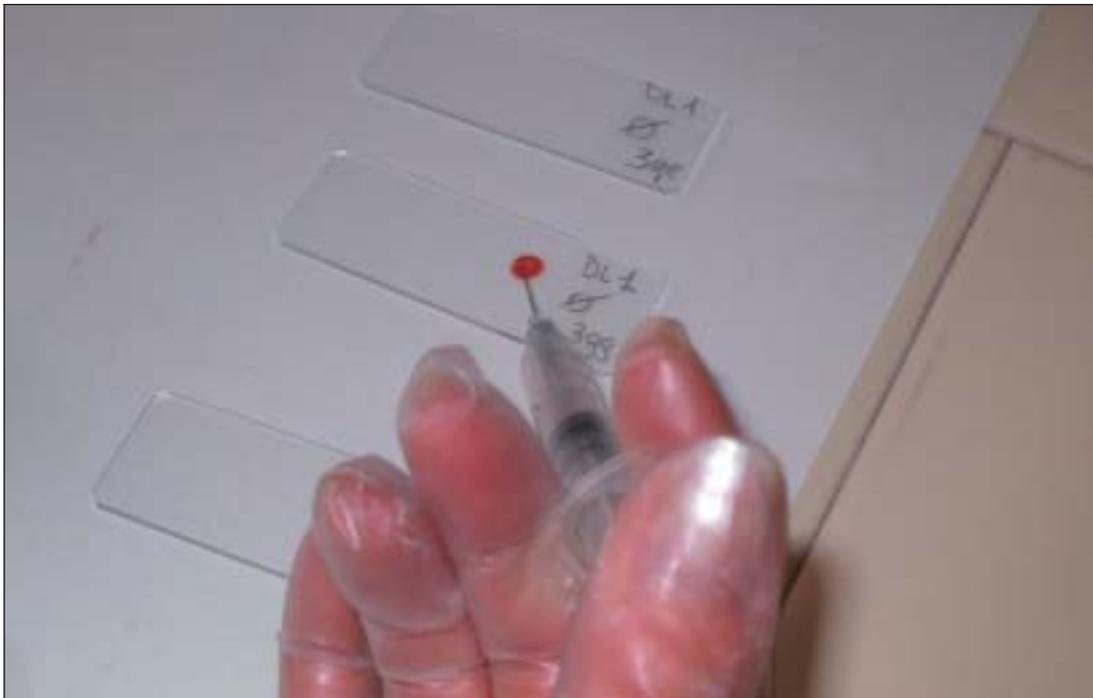


Fig. 9 - Preparazione dello striscio

6.8.4 Colorazione e montaggio dei vetrini

- Immergere gli strisci per 10' in una vaschetta per colorazioni contenente alcool metilico assoluto
- Idratare gli strisci immergendoli in una vaschetta contenente acqua di rubinetto
- Immergere gli strisci in una soluzione di Giemsa al 10% (10 ml Giemsa + 90 ml acqua di rubinetto) per 15 minuti
- Sciacquare con acqua distillata e far asciugare all'aria.



Fig. 10 - Asciugatura degli strisci all'aria

- Con una pinza prendere un vetrino asciutto e poggiarlo su un piano
- Porre una goccia di montante Eukitt su un vetrino coprioggetto e far aderire, esercitando una leggera pressione, al vetrino portaoggetto.

6.8.5 Lettura dei vetrini al microscopio ottico

- Posizionare un vetrino sul tavolino del microscopio e inserire l'obiettivo 10X
- Scorrere il vetrino per l'individuazione di una zona con eritrociti ben distribuiti (vedi criteri paragrafo 6.10).
- Porre una goccia d'olio sul vetrino e inserire l'obiettivo 100 X ad immersione e dare inizio alle osservazioni
- Annotare sul "Foglio di registrazione", in allegato 1, le coordinate X-Y della posizione su vetrino da cui ha inizio il conteggio e spostarsi lungo il vetrino in senso orizzontale, annotando anche la direzione di spostamento (verso destra o verso sinistra).
- Giunti al bordo (destro o sinistro) del vetrino riportare le conte ottenute sul foglio di registrazione
- Scendere di un campo di osservazione, prendere nuovamente nota delle coordinate X-Y e del verso di spostamento lungo il vetrino e proseguire la conta.
- Contare in totale 2000 eritrociti.
- Le cellule, da registrare separatamente, sono:

eritrociti normali (EN)
eritrociti con 1 micronucleo (E1MN)
eritrociti con 2 micronuclei (E2MN)

Per il riconoscimento e la corretta classificazione delle cellule vedere i criteri riportati al paragrafo 6.10.

6.9 Metodo Cytospin

6.9.1 Requisiti preliminari

Pulizia dei vetrini

Come descritto nel paragrafo 6.8.1.

Preparazione del terreno di mantenimento del sangue

La preparazione del terreno di mantenimento per il sangue deve essere realizzata sotto cappa biologica di sicurezza (classe II A), utilizzando materiale sterile, monouso o sterilizzato in autoclave (121°C per 20'). In queste condizioni il terreno di mantenimento può essere conservato in frigo (2-4°C) anche per 3 mesi.

Prove interne di laboratorio hanno dimostrato che il sangue prelevato dal branzino miscelato con il terreno di mantenimento e conservato in frigo (2-4°C) si mantiene inalterato per almeno 48 ore.

La quantità di terreno da preparare è pari a 1 ml per branzino.

La procedura descritta è relativa alla preparazione del terreno per 50 branzini.

- In una beuta (in vetro, collo largo, capacità 100 ml) sterile, trasferire 46,6 ml di terreno di coltura RPMI 1640.
- Aggiungere 1,7 ml di una soluzione di Penicillina-Streptomicina (5000 u/ml – 5 mg/ml) e miscelare.
- Aggiungere 1,7 ml di eparina sodica (5000 u/ml) e miscelare.
- Riempire una siringa sterile da 5 ml con 5 ml di terreno di mantenimento.
- Trasferire il terreno in provette vacutainer (tappo verde) in ragione di 1 ml/provettata: il trasferimento deve avvenire inserendo l'ago nella parte centrale del tappo della vacutainer, senza eliminare il vuoto.
- Conservare le vacutainer contenenti il terreno in frigo (2-4°C) fino al momento dell'uso.

6.9.2 Prelievo del sangue: puntura della vena caudale

Come descritto nel paragrafo 6.8.2.

6.9.3 Cytospin

La tecnica "Cytospin" consente di preparare, attraverso l'utilizzo della citocentrifuga Cytospin (fig. 11), i vetrini con una migliore distribuzione cellulare che può risultare utile al momento delle osservazioni al microscopio. Con il sangue di ogni branzino sono preparati due vetrini come segue:

- Siglare la provetta vacutainer, contenente il terreno di mantenimento, con il numero del campione.
- Aprire il tappo in gomma della vacutainer e trasferire delicatamente il sangue prelevato nel terreno di mantenimento (1 ml); chiudere e miscelare agitando delicatamente la provetta. Misurare il volume totale della sospensione.
- Prelevare un'aliquota di sospensione cellulare e contarla utilizzando una camera di conta (Neubauer modificata) o il Coulter Counter.



Fig. 11 - Citocentrifuga "Cytospin"

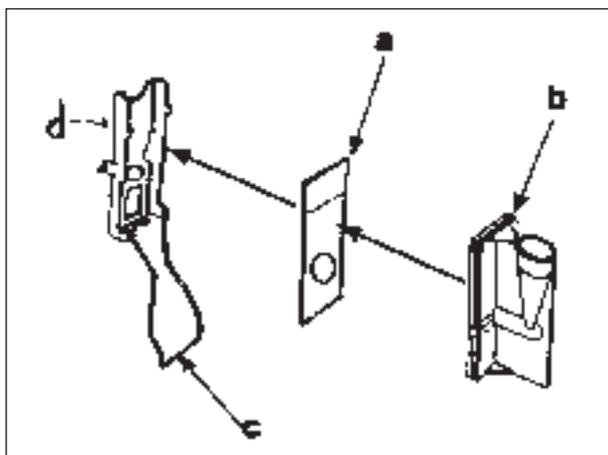


Fig. 12 - Supporto della citocentrifuga. a: vetrino; b: imbuto cytofunnel; c: chiusura; d: supporto metallico

- Calcolare la densità cellulare (cellule/ml).
- Se occorre, diluire la sospensione cellulare, con terreno di coltura RPMI 1640, in modo da ottenere una densità cellulare di 300,000-500,000 cellule/ml.
- Siglare i vetrini precedentemente puliti e sgrassati.
- Montare i supporti per la citocentrifuga come mostrato in figura 12.
- Miscelare bene la sospensione cellulare prima con una pipetta Pasteur in vetro e poi con il vortex.
- Trasferire, con una micropipetta, 0,1 ml di sospensione cellulare (30,000-50,000 cellule) nell'imbuto "cytofunnel" e centrifugare 1000 rpm per 5'.
- Osservare il vetrino al microscopio con obiettivo a contrasto di fase: le cellule devono risultare uniformemente distribuite e monodisperse su un'area circolare del diametro di 0,4 mm.
- Se il vetrino realizzato risulta soddisfacente, preparare il secondo vetrino con identiche modalità.

6.9.4 Colorazione e montaggio dei vetrini

Come descritto nel paragrafo 6.8.4

6.9.5 Lettura dei vetrini al microscopio ottico

Le cellule ottenute con la tecnica della centrifugazione con Cytospin sono disperse sul vetrino all'interno di una regione circolare ben delimitata, del diametro di 0,4 mm. Procedere per la lettura come segue:

- Posizionarsi con l'obiettivo 10X sul confine destro della regione circolare nel punto indicato dalla freccia rossa in figura, e mettere a fuoco sulle prime cellule che si incontrano; prendere nota delle coordinate X-Y del punto di inizio della lettura.
- Porre una goccia d'olio sul vetrino e inserire l'obiettivo 100 X ad immersione.
- Iniziare il conteggio delle diverse tipologie cellulari, utilizzando il contatore manuale, e muovendosi lungo il vetrino secondo le frecce mostrate nell'immagine di figura 13.

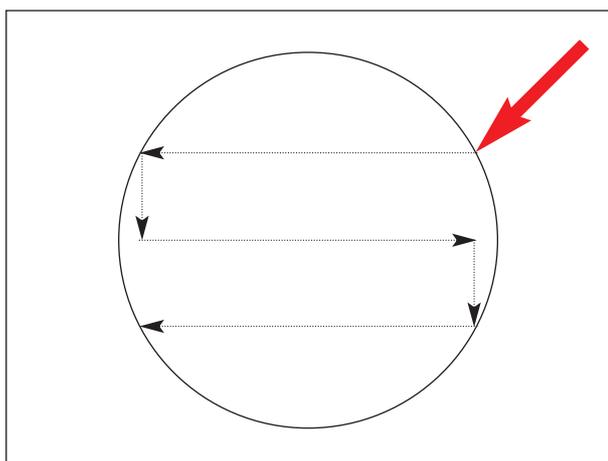


Fig. 13 - Movimenti lungo il vetrino per il conteggio degli eritrociti su spot di Cytospin

manuale, e muovendosi lungo il vetrino secondo le frecce mostrate nell'immagine di figura 13.

- Contare 2000 eritrociti totali, registrando separatamente sull'apposito foglio di lettura (allegato 1):
eritrociti normali (EN);
eritrociti con 1 micronucleo (E1MN);
eritrociti con 2 micronuclei (E2MN).

Per il riconoscimento e la corretta classificazione delle cellule vedere i criteri riportati al paragrafo 6.10.

6.10 Criteri di distribuzione e riconoscimento delle cellule al microscopio ottico

Distribuzione delle cellule su vetrino

Il conteggio degli eritrociti deve essere effettuato solo nelle zone del vetrino dove le cellule risultano correttamente distribuite.

Una distribuzione può considerarsi accettabile (figure 14 A -14 D) quando almeno il 50% delle cellule, visibili in ogni campo di osservazione, risponde ai requisiti da 7 a 10 sottoelencati.

Nelle zone ad elevata concentrazione cellulare (figura 14 E, 14 F) il conteggio non può essere effettuato.

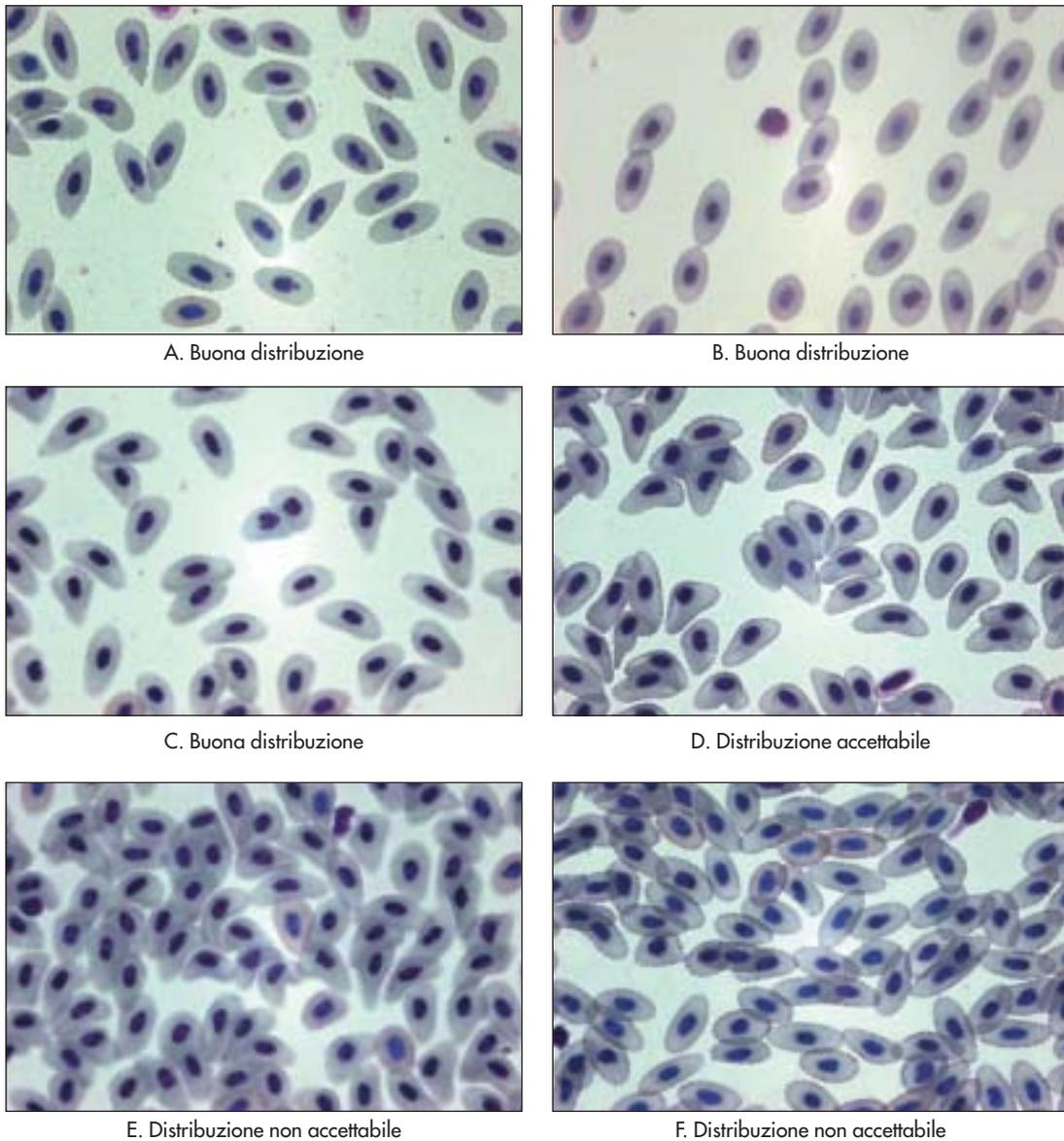
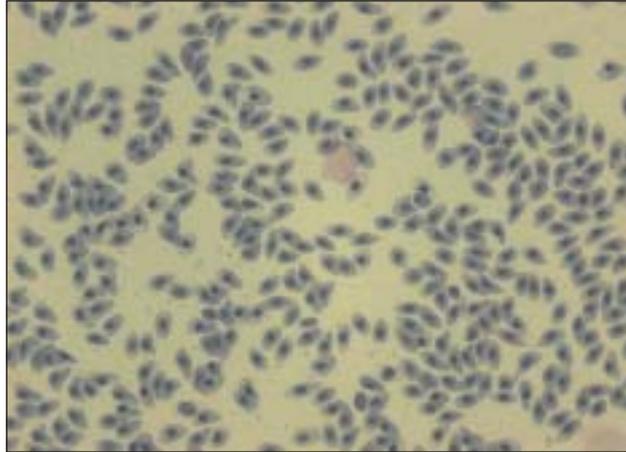


Fig. 14 - Strisci su vetrino di sangue periferico di *Dicentrarchus labrax* (ingrandimento 100 X)

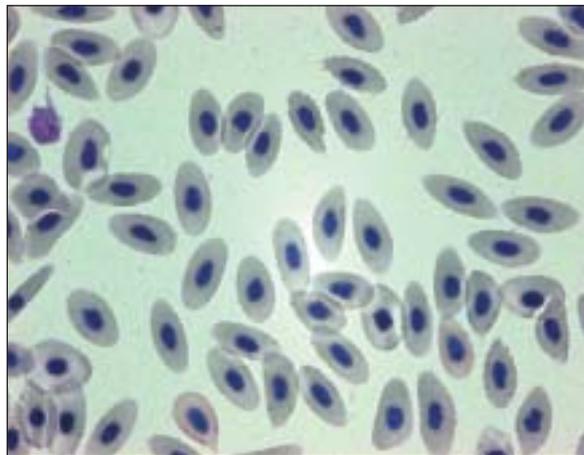
Le figure da 15 A a 15 C mostrano la distribuzione cellulare ottenuta con la tecnica "Cytospin".

Eritrociti (figura 16 A e 16 B):

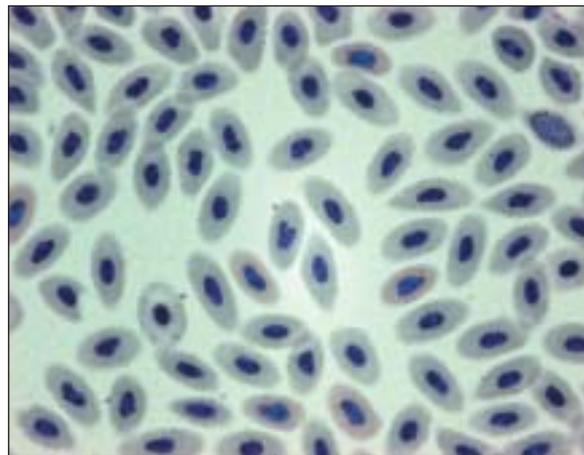
1. devono essere di forma pressochè ovale
2. devono essere circondati dalla membrana plasmatica



A. (Ingrandimento 40X)



B. (Ingrandimento 100X)



C. (Ingrandimento 100X)

Fig. 15 - Microfotografie di eritrociti di sangue periferico di *Dicentrarchus labrax* distribuiti su vetrino con la tecnica "Cytospin"

Nucleo degli eritrociti (figura 16 A):

3. deve essere di forma ovale o lievemente rotondeggiante
4. deve essere di colore blu-viola più o meno scuro
5. deve essere compatto
6. deve avere la membrana nucleare intatta
7. Il confine citoplasmatico di un eritrocita deve essere distinguibile da quello di ogni altro eritrocita (figura 16 B e 16 C) ;
8. Gli eritrociti possono toccarsi (fig. 16 D);
9. Gli eritrociti completamente sovrapposti tra loro (figura 16 F) non possono essere accettati nel conteggio;
10. Se accade che due cellule siano sovrapposte, possono essere accettate nel conteggio solo se la sovrapposizione interessa una piccola parte del citoplasma (fig. 16 E) e i confini cellulari siano visibili in trasparenza.
11. Gli eritrociti con anomalie della forma del nucleo (Figure 18 A - 18 F) devono essere registrati separatamente o essere esclusi se il conteggio riguarda solo gli eritrociti normali.

Micronuclei

Il micronucleo (figura 17):

12. Ha forma rotondeggiante (figura 17 G, 17 H) o ovale (figura 17 A, 17 E).
13. È più piccolo del nucleo principale (da 1/10 fino ad 1/30 del nucleo principale).
14. Ha stessa intensità di colore del nucleo principale; solo occasionalmente può essere più chiaro (fig. 17 H) o più scuro di esso.
15. Non rifrange la luce (agendo sulla manopola del fuoco, non ci deve essere "l'effetto specchio" come accade con gli artefatti della colorazione).
16. Non ha connessioni con il nucleo principale.
17. Può toccare il nucleo principale (fig.17 H), ma non sovrapporsi ad esso e i confini dei due nuclei devono essere perfettamente distinguibili.
18. Può trovarsi anche negli eritrociti il cui nucleo principale ha forme anomale. Questo accade quando la cellula è trattata con elevate concentrazioni di sostanze genotossiche che inducono molti tipi di anomalie nucleari. In questo caso se l'osservazione prevede, oltre al conteggio dei micronuclei, anche il conteggio dei nuclei anomali, la cellula viene registrata come eritrocita con nucleo anomalo e eritrocita con micronucleo.

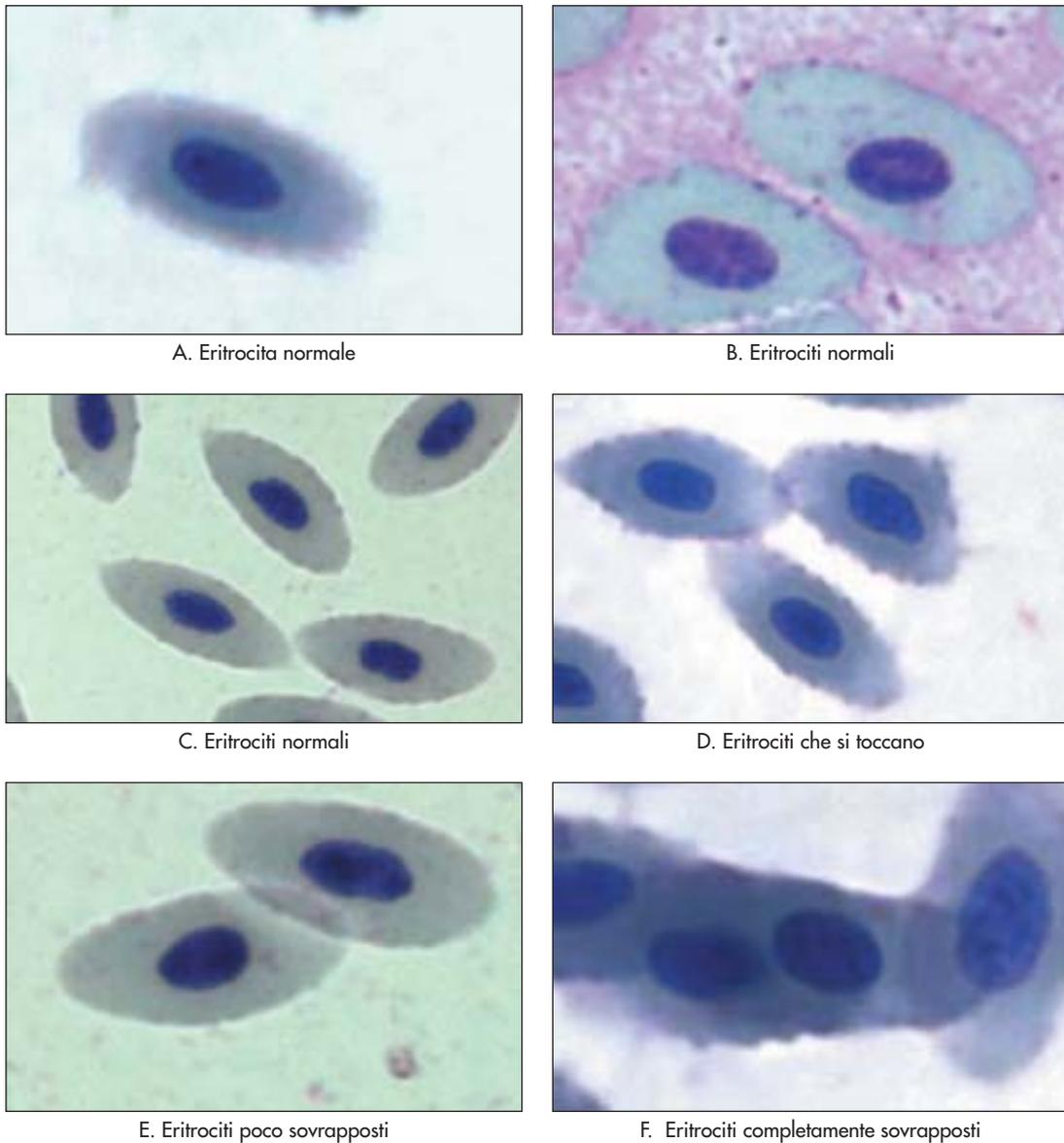


Fig. 16 - Microfotografie di eritrociti di *Dicentrarchus labrax* (ingrandimento 100 X)

Anomalie Nucleari

Negli eritrociti di pesce, oltre ai micronuclei, sono state descritte anche altre anomalie del nucleo (NA, nuclear abnormalities). Alcune di esse sono state classificate da Carrasco et al. (1990) come nuclei "blebbed", vescicolari (fig. 18 A e 18 B), "notched", dentellati (fig. 18 C e 18 D), "lobed", lobati e "binucleated", con due nuclei. Nelle figure 18 E e 18 F sono mostrate anomalie del nucleo da noi osservate su eritrociti di *Dicentrarchus labrax*, ma non ancora classificate.

Secondo alcuni autori le anomalie nucleari si sono dimostrate buoni indicatori di dan-

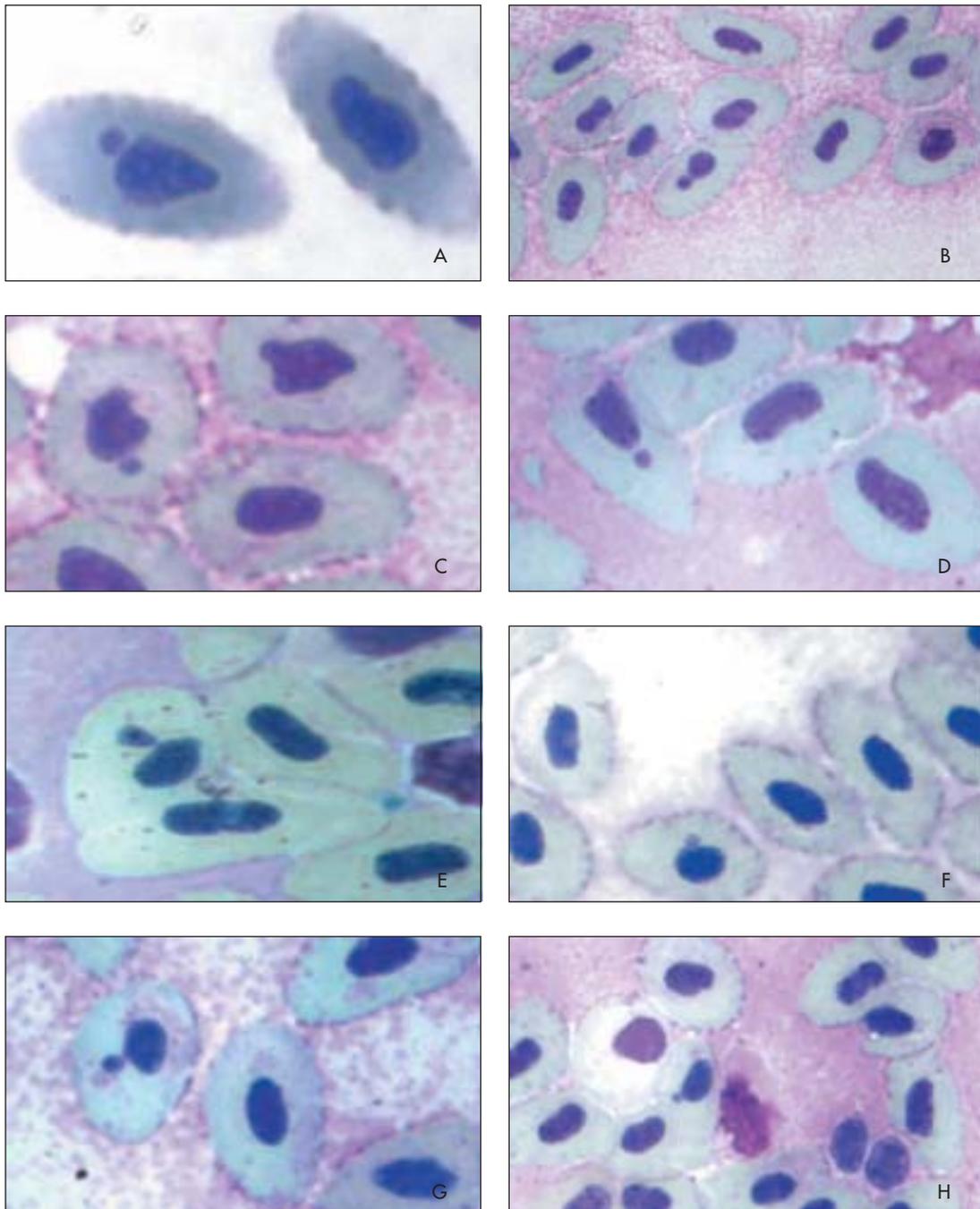
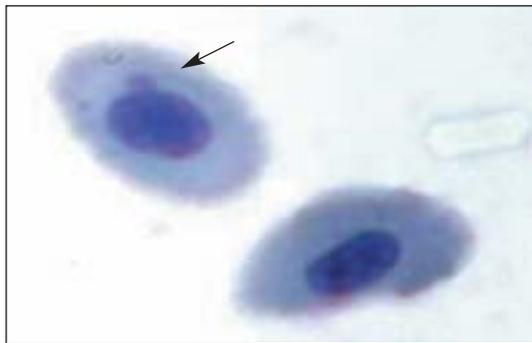


Fig. 17 - Microfotografie di eritrociti di *Dicentrarchus labrax* contenenti micronuclei (ingrandimento 100 X

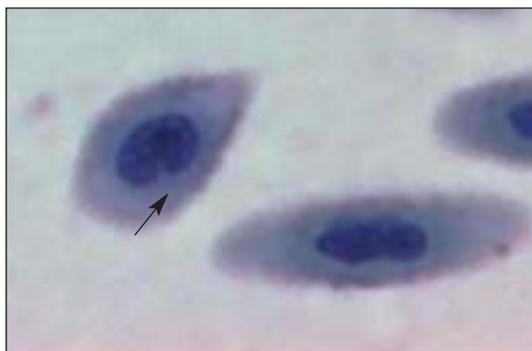
no genotossico (Bombail et al., 2001; Pacheco and Santos, 1998; Ayylon F., 2000) sebbene il loro meccanismo di formazione non sia ancora stato compreso (Cavas and Gozuraka, 2003).



A. Eritrocita con nucleo "Blebbled"



B. Eritrocita con nucleo "Blebbled"



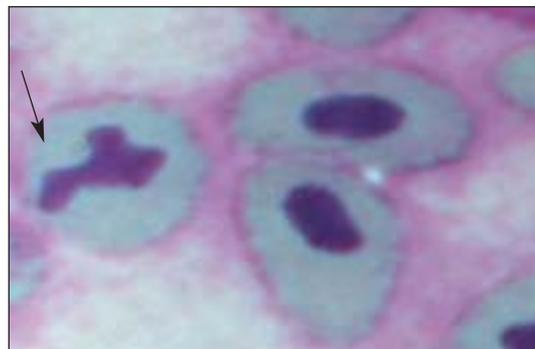
C. Eritrocita con nucleo "Notched"



D. Eritrocita con nucleo "Notched"



E. Eritrocita con nucleo anomalo



F. Eritrocita con nucleo anomalo

Fig. 18 - Microfotografie di eritrociti con anomalie nucleari della specie *Dicentrarchus labrax* (ingrandimento 100 X)

Uno studio condotto da APAT circa l'osservazione e il conteggio delle anomalie nucleari su eritrociti di spigola dopo esposizione a benzene (10 ppm) per 3 e 6 giorni fornisce indicazioni positive circa l'utilizzo di questi indicatori per la valutazione del danno genotossico. Nella tabella 9 sono mostrate le frequenze individuali di NA (NA tot./Cellule totali x 1000) ottenute sui branzini. Il trattamento con benzene alla concentrazione di 10 ppm per 3 gg non modifica la frequenza delle NA come risulta dal confronto tra le FNA medie calcolate (tabella 10): $8,1 \pm 1,48$ (benzene 3 gg) vs $9,5 \pm 1,43$ (controllo) ($p=0,438$, t-Student).

Tab. 9 - Frequenze individuali delle NA (FNA) dopo esposizione a benzene

Trattamento	Pesce N°	NA				NA Tot.	Cellule totali	FNA ‰
		BL	NT	LB	BN			
Controllo	1	4	3	4	4	15	1503	10,0
	2	6	5	1	8	20	1867	10,7
	3	2	3	2	1	8	1500	5,3
	4	3	1	1	8	13	998	13,0
	5	6	2	4	2	14	615	22,8
	6	9	4	1	6	20	1971	10,1
	7	7	4	4	3	18	2068	8,7
	8	6	2	0	3	11	1762	6,2
	9	7	1	1	1	10	1500	6,7
	10	8	3	1	2	14	1500	9,3
	11	10	2	0	0	12	1512	7,9
	12	4	1	0	0	5	1500	3,3
Benzene 3 gg (10 ppm)	1	4	5	5	3	17	2100	8,1
	2	0	0	0	8	8	1465	5,5
	3	0	0	0	3	3	1840	1,6
	4	2	5	0	1	8	1500	5,3
	5	10	3	0	4	17	1501	11,3
	6	11	4	2	7	24	1500	16,0
	7	5	6	3	3	17	1474	11,5
	8	12	4	0	3	19	1501	12,7
	9	5	4	2	5	16	1500	10,7
Benzene 6 gg (10 ppm)	1	27	13	17	24	81	2000	40,5
	2	12	8	10	4	34	541	62,8
	3	54	9	22	7	92	2104	43,7
	4	14	3	3	3	23	1000	23,0
	5	17	14	25	26	82	2004	40,9
	6	22	11	8	9	50	2000	25,0
	7	19	33	12	7	5	1450	39,3

Tab. 10 - Elaborazione dati sulle anomalie nucleari dopo trattamento con benzene

Trattamento	FNA _m	ST	STM	CV%
Controllo	9,5	4,95	1,43	52,1
Benzene (10 ppm) 3 gg	8,1	4,44	1,48	54,9
Benzene (10 ppm) 6 gg	40,5	13,20	4,99	32,6

FNA_m: frequenza media delle anomalie nucleari; ST: scarto tipo; STM: scarto tipo della media; CV%: coefficiente di variazione

L'esposizione per 6 gg determina invece un aumento significativo della FNA media ($40,5 \pm 4,99$) rispetto al controllo ($p < 0,01$, t-Student). I dati ottenuti forniscono un'indicazione positiva, ma la loro elevata variabilità non permette di trarre considerazioni conclusive. Si ritiene necessario uno studio accurato sul riconoscimento al microscopio delle anomalie nucleari con letture ripetute di campioni per stabilire i valori di incertezza legati alla lettura.

6.11 Elaborazione dei dati

La misura del danno genotossico indotto si ottiene confrontando la frequenza media dei micronuclei ottenuta sul campione esposto all'inquinante con la frequenza media dei micronuclei ottenuta sui campioni di controllo.

La frequenza dei micronuclei (FMN) è data dal rapporto tra il numero totale di micronuclei e il numero totale di eritrociti osservati. Da questo valore, moltiplicato per 1000, si ottiene la FMN‰ che ci dice quanti micronuclei ci sono in 1000 cellule.

Nella figura 19 è mostrato un esempio di elaborazione dati in cui viene valutato l'effetto genotossico del benzene alla concentrazione di 10 ppm sugli eritrociti di *Dicentrarchus labrax*.

Procedere come segue:

- Per ogni branzino (del controllo e del trattato) contare i micronuclei (MN) presenti in 2000 eritrociti normali (EN); riportare questi valori su due colonne di un foglio Excell (colonna D ed E nell'esempio di figura 19).
- Impostare il rapporto $(MN/EN) \times 1000$ come funzione di Excell e calcolare le FMN‰ individuali (colonna F dell'esempio di figura 19).
- Utilizzando la funzione "MEDIA" di Excell calcolare la FMN media del controllo e la FMN media del trattato (colonna H di figura 19).
- Utilizzando la funzione "DEV.ST" di Excell calcolare lo scarto tipo (ST) (colonna I di figura 19).
- Impostare il rapporto tra ST e radice quadrata del numero di osservazioni come funzione di Excell e calcolare lo scarto tipo della media (STM). Nell'esempio di figura 19 (colonna L) il valore di $8E-02$ si ottiene da $0,250/\sqrt{10}$ e il valore di $0,287$ si ottiene da: $0,908/\sqrt{10}$.
- Impostare il rapporto $(ST/FMN \text{ media}) \times 100$ come funzione di Excell e calcolare il coefficiente di variazione. Nell'esempio di figura 19 (colonna M) il valore $37,31$ del controllo si ottiene da: $(0,250/0,67) \times 100$; il valore $19,61$ ottenuto nel trattato si ottiene da $(0,908/4,59) \times 100$.
- Calcolare con la funzione "TEST T" di Excell la probabilità (p) associata mettendo a confronto le FMN‰ individuali del controllo e del trattato. Se il t-test fornisce un $p < 0,05$ l'aumento di FMN riscontrato nel trattato può considerarsi significativo.

FMN individuali		A	B	C	D	E	F	G	H	I	L	M	N
Tempo esposizione	Treatmento	n° pesce	MN	EN	FMN % (MN/EN)x1000								
3 giorni	Controllo	1	2	2000	1,00								
		2	1	2000	0,50								
		3	2	2000	1,00								
		4	1	2000	0,50								
		6	1	2000	0,50								
	Benzene (10 ppm)	7	2	2000	1,00								
		8	1	2000	0,50								
		9	1	2000	0,50								
		10	1	2000	0,50								
		10	1	2000	0,50								
3 giorni	Benzene (10 ppm)	1	5	2100	2,38								
		2	10	2000	5,00								
		3	8	2000	4,00								
		4	9	2000	4,50								
		5	11	2000	5,50								
		6	11	2000	5,50								
		7	10	2000	5,00								
		8	9	2000	4,50								
		9	9	2000	4,50								
		10	10	2000	5,00								

ELABORAZIONI				
Treatmento	FMN media	ST	STM	CV
Controllo	0,67	0,250	8E-02	37,31
Benzene (10 ppm)	4,59	0,908	0,287	19,61

ST: scarto tipo o deviazione standard
STM: scarto tipo della media. Si ottiene dal rapporto tra lo scarto tipo e la radice quadrata del numero di osservazioni
CV: Coefficiente di Variazione. Si ottiene dal rapporto tra lo scarto tipo e la media, moltiplicato per 100
p: probabilità associata ad un test t di Student

MN: Micronuclei; EN: Eritrociti Normali; FMN: Frequenza dei micronuclei

Fig. 19 - Esempio di elaborazione dei dati

7. ALLEGATO 1

 APAT	Foglio di Registrazione
--	--------------------------------

OPERATORE	DATA DELLA LETTURA
CODICE VETRINO	MICROSCOPIO

A	B	C	D	E	F	G
X	Y	EN	E 1MN	E 2MN	MNtot	ENtot

EN: Eritrociti normali; E1MN: Eritrociti con 1 micronucleo; E2MN: Eritrociti con 2 micronuclei; MNtot: Micronuclei totali; ENtot: Eritrociti normali totali.

8. BIBLIOGRAFIA

Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R., Hagmar L. Et al., 2000, ICPS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research* 463: 111-172.

Al-Sabti K., 1986, Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals, *Cytobios* 47: 147-154.

Al-Sabti K. And Hardig J., 1990, Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of the industrial waste products in the Baltic sea, Sweden, *Comp. Bioch. Physiol.* 97C:179-182.

Al-Sabti K., 1992, Micronuclei induction in pike (*Esox Lucius*) in Swedish lakes contaminated with radiocaesium. *Cytobios*, 70: 101-106.

Al-Sabti K., Franko M., Andrijani B., Knez S., and Stegnar P., 1994, Chromium induced micronuclei in fish. *Journal Appl. Toxicology* 14: 333-336.

Al-Sabti K., Metcalfe C.D., 1995, Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water, *Mutation Research* 343: 121-135.

Al-Sabti K., 2000, Chlorotriazine reactive azo red 120 textile dye induces micronuclei in fish, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 47:149-155.

Ayllon F., Garcia-Vazquez E., 2000, Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test, *Mutation Research* 467: 177-186.

Ayllon F., and Garcia-Vazquez E., 2001, Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Onchrorhynchus mykiss*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 221-225.

Bahari I.B., Noor F.M., and Daud N.M., 1994, Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*. *Mutation Research* 313: 1-5.

Bascom W., 1988, L'eliminazione dei rifiuti nell'oceano. *Le Scienze*, Quaderni "Il rischio chimico" n. 40 febbraio 1988, pp.25-32.

Bolognesi C., Venier P., 2003, Monitoraggio della genotossicità in matrici ambientali: acqua. In "Mutagenesi ambientale" di Autori vari pp. 263-280, Zanichelli.

Bonassi S., Fenech M., Lando C., Lin Y.P., Ceppi M., Chang W.P., Holland N., Kirsch-Volders M., et al., 2001, HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes I: Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental Molecular Mutagenesis* 37: 31-45.

Campana M.A., Panzeri A.M., Moreno V.J., Dulout F.N., 1999, Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*, *Mutation Research* 438: 155-161.

Cavaş T. and Gözükara S.E., 2003a, Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells, *Mutation Research* 534: 93-99.

Cavaş T. and Gözükara S.E., 2003b, Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent, *Mutation Research* 538: 81-91.

Carrasco K.R., Tilbury K.L. and Myers M.S., 1990, An assessment of the piscine micronuclei test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects, *Canadian Journal Fish Aquatic Science* 47:2123-2136.

Catena C., Conti D., Parasacchi P., Marengo P., Bortolato B., Botturi M., Leoni M., Portaluri M., Paleani-Vettori P.G. and Righi E., 1996, Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes may predict patient response to radiotherapy. *International Journal Radiation Biology* 70: 301-308.

Catena C., Parasacchi P., Conti D., Sgura A., Trenta G., Righi E., Trinci M.M. and Trinci M., 1997, Peripheral blood lymphocyte decrease and micronucleus yields during radiotherapy. *International Journal Radiation Biology* 72: 575-585.

Conti D., Bellaria V., Belli M., Gelli F. et al., 2004, Determinazione della concentrazione di non-effetto a 9 giorni e test del micronucleo per valutazioni di genotossicità dei disperdenti degli idrocarburi petroliferi su *Dicentrarchus labrax* L., *Atti del 35° Congresso Società Italiana Biologia Marina (SIBM)*. Genova 19-20 luglio 2004, p. 193.

Countryman J.I., Heddle J.A., 1976, The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research* 41: 321-332.

Crebelli R., Carta P., Andreoli C., Aru G., Dobrowolny G., Rossi S. and Zijno A., 2002, Biomonitoring of primary aluminium industry workers: detection of micronuclei and reparable DNA lesions by alkaline SCGE. *Mutation Research* 516: 63-70.

Das R.K. and Nanda N.K., 1986, Induction of micronuclei in peripheral erythrocyte of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent, *Mutation Research*, 175: 67-71.

De Boeck M., Lombaert N., De Backer S., Finsy R., Lison D., Kirsch-Volders M., 2003, In vitro genotoxic effects of different combinations of cobalt and metallic carbide particles. *Mutagenesis* 18:177-186.

Evans H.J., Neary G.J., Williamson F.S., 1959, The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays in *Vicia Faba* roots and the effect of oxygen: Part II, Chromosome damage; The production of micronuclei, *International Journal Radiation Biology* 1: 230-240.

Farah A.M., Ateeq B., Ali N.M. and Ahmad W., 2003, Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54: 25-29.

Fenech M., Morley A.A., 1985, Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research* 147: 29-36.

Fenech M., 1997a, The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research* 392: 11-18.

Fenech M., Perepetskaya G., Mikhalevic L., 1997b, A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations. Experiences from the Chernobyl catastrophe. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30: 112-118.

Fenech M., 1998, Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes – a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutation Research* 404:155-165.

Fenech M., Chang WP, Kirsch-Volders M., Holland N., Bonassi S., Zeiger E., 2003, HUMN project:detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534: 65-75.

Gravato C. and Santos M.A., 2003a, Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L., *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55:352-358.

Gravato C. and Santos M.A., 2003b, Dicentrarchus labrax biotransformation and genotoxicity responses after exposure to a secondary treated industrial/urban effluent, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55:300-306.

Grisolia C.K., and Starling F.L.M.R.F., 2001, Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoà under influence of sewage treatment plant discharges. *Mutation Research* 491: 39-44.

Hooftman R.N. and De Raat W.K., 1982, Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in peripheral blood erythrocytes of Eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate, *Mutation Research* 104: 147-152.

Hose J.E., Cross J.N., Smith S.G. and Diehl D., 1987, Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California, *Marine Environmental Research* 22: 167-176.

Leonzio C., Fossi M. C., Marsili L., Casini S., 2003, Indagini ecotossicologiche sugli organismi del benthos. *Biologia Marina Mediterranea* 10 (Suppl.): 549-576.

Lison D., De Boeck M., Verougstraete V., Kirsch-Volders M., 2001, Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occupational Environmental Medicine* 58: 619-625

Longwell A.C., Perry D., Hughes J.B. and Hebert A., 1983, Frequencies of micronuclei in mature and immature erythrocytes of fish as an estimate of chromosome mutation rates-results of field surveys on windowpane flounder, winter flounder and atlantic mackerel. ICES, C.M. 1983/E:55, M.E.Q., Demersal and Pelagic Fish Committees.

Maria V.L., Correia A.C. and Santos M.A., 2002, *Anguilla anguilla* L. biochemical and genotoxic responses to benzo(a)pyrene, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53: 86-92.

Manna G.K. and Sadhukhanm A., 1986, Use of cells of gill and kidney of Tilapia fish in micronucleus test (MNT), *Current Science*, 55:498-501.

Metcalfe C.D., 1988, Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocyte of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*), *Bulletin Environmental Contam. Toxicol.*, 40: 489-495.

Mitchelmore C.L., Chipman J.K., 1998, DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring, *Mutation Research* 399:135-147.

Mosesso P., 2003, La mutazione cromosomica. In "Mutagenesi ambientale" di Autori vari pp. 32-51, Zanichelli.

Nepomuceno J.C., Ferrari I., Sanò M.A. and Centino A.J., 1997, Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury, *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30: 293-297.

Pacheco M. and Santos M.A., 2002, Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) – *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53: 331-343.

Palhares D. and Grisolia C.K., 2002, Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in *Tilapia* fish, following mitomycin C treatment, *Genetics and Molecular Biology* 25: 281-284.

Rajaguru P., Suba M., Palnivel M. and Kaliselvi K., 2003, Genotoxicity of polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 41: 85-91.

Rodriguez-Cea A., Ayllon F. and Garcia-Vazquez E., 2003, Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56:442-448.

Sanchez-Galan S., Lin de A.R., Ayllon F. and Garcia-Vazquez E., 2001, Induction of micronuclei in Eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy Metals, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49: 139-143.

Shibamoto Y., Streffer C., Fuhrmann C. and Budach V., 1991, Tumor radiosensitivity prediction by the cytokines-Block micronucleus assay. *Radiation Research* 128: 293-300.

Schultz N., Norrgren L., Grawe J., Johannisson A. and Medhage O., 1993, Micronuclei frequency in circulating erythrocytes from rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) subjected to radiation, an image analysis and flow cytometric study, *Comp. Biochem. Physiol.* 105C:207-211.

Suzuki H., 1988, Inquinamento da PCB, *Le Scienze Quaderni "Il rischio chimico"* n. 40 febbraio 1988, pp. 80-87.

Teles M., Pacheco M. and Santos M.A., 2003, *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities and endocrine responses to naphthalene and b-naphthoflavone, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55:98-107.

Thoday J.M., 1951, The effect of ionizing radiations on the broad bean root. Part IX Chromosome breakage and the lethality of ionising radiations to the root meristem. *British Journal Radiology* 24: 572-576.

Touil N., Aka P.V., Buchet JP, Thierens H., Kirsch-Volders M., 2002, Assessment of genotoxic effects related to chronic low level exposure to ionising radiation using biomarkers for DNA damage and repair. *Mutagenesis* 17:223-232.

Ueda T., Hayashi M., Ohtsuka Y., Nakamura T., Kobayashi J. and Sofuni T., 1992, A preliminary study of the micronucleus test by acridin orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells, *Water Sci. Tech.* 25 (11): 235-240.

Williams R.C., and Metcalfe C.D., 1992, Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout, *Aquatic Toxicology* 23: 193-202.

9. GLOSSARIO

Aberrazioni cromosomiche - Mutazioni cromosomiche strutturali che comportano cambiamenti nella sequenza del DNA lungo l'asse del cromosoma. Se gli eventi di rottura che le generano sono seguiti da riunioni in modo che i cromosomi coinvolti vengano riorganizzati strutturalmente si parla di riarrangiamenti strutturali; in caso contrario si originano delezioni.

Addotti al DNA - Prodotti del legame covalente tra uno xenobiotico (*vedi xenobiotico*) o un suo metabolita e i gruppi nucleofili (*vedi nucleofilo*) della molecola del DNA.

Agenti clastogeni - Agenti di natura fisica, chimica o biologica capaci di indurre aberrazioni cromosomiche. Vedi anche agenti S-dipendenti e S-indipendenti.

Agenti S-dipendenti - Agenti clastogeni che necessitano della fase di sintesi del DNA perché la lesione indotta si fissi. Le aberrazioni prodotte saranno solo di tipo cromatidico. La maggior parte delle sostanze chimiche appartiene a questa categoria.

Agenti S-indipendenti - Agenti clastogeni che esplicano la loro attività immediatamente (per esempio i raggi X e le sostanze radiomimetiche come la bleomicina). Essi producono un danno diverso (cromosomico o cromatidico) a seconda della fase del ciclo cellulare in cui la cellula si trova al momento dell'esposizione.

Anafase - Fase della mitosi (*vedi fase M o mitosi*) in cui i cromosomi migrano ai poli opposti del fuso mitotico (*vedi fuso mitotico*).

Bioaccumulo - Concentrazione dell'inquinante all'interno dell'organismo rispetto all'ambiente.

Biodisponibilità - Quantità di sostanza chimica, presente in una matrice ambientale, accessibile agli organismi viventi.

Biomagnificazione - Aumento di concentrazione dell'inquinante da un livello della catena alimentare a quello superiore.

Biota - Insieme degli organismi viventi di un ecosistema.

Carico mutazionale - Mutazioni deleterie complessivamente presenti nei geni di una popolazione.

Centromero - Costrizione primaria del cromosoma che include il sito di attacco (cinetocoro) al fuso mitotico e meiotico.

Ciclo cellulare - È il periodo compreso tra una divisione e quella successiva. Si compone delle seguenti fasi: G1, S, G2 e M.

Cinetocoro - Struttura del cromosoma all'interno del centromero (*vedi centromero*) a cui si attaccano i microtubuli del fuso mitotico durante l'anafase (*vedi anafase*).

Citochinesi - Processo di divisione del citoplasma.

Cromosoma - Unità del genoma che porta numerosi geni, visibile come entità morfologicamente distinta durante la divisione cellulare.

Cross-link - Legami crociati, ad esempio intra- e inter-elica di DNA.

Danno ossidativo - Lesioni al DNA (rotture a singola e doppia elica, ossidazione delle basi, lesioni in tandem) provocate dai prodotti reattivi dell'ossigeno, come ad esempio i ROS (Reactive Oxygen Species) che includono i radicali superossidi, ossido nitrico, perossido di idrogeno e radicali idrossilici.

Endocrine Disruptor Compound (Disgregatori delle funzioni endocrine) - Composti che determinano effetti avversi su un organismo e la sua progenie alterando le funzioni endocrine e che hanno come organi bersaglio il sistema riproduttivo, il sistema nervoso centrale, la tiroide e il sistema immunitario.

Eritrociti (globuli rossi) - Cellule differenziate specializzate nel trasporto di ossigeno ai tessuti attraverso la circolazione sanguigna.

Fase G₀ - Fase di quiescenza delle cellule.

Fase G₁ - Primo intervallo (Gap) del ciclo cellulare in cui la cellula prepara i componenti che le serviranno per la fase successiva di sintesi del DNA.

Fase S - Fase di sintesi (duplicazione) del DNA.

Fase G₂ - Secondo intervallo (Gap) del ciclo cellulare in cui la cellula prepara i componenti che le serviranno per la mitosi.

Fase M o Mitosi - Processo di divisione delle cellule somatiche caratterizzato da 4 fasi: profase, metafase, anafase e telofase.

Fenotipo - Insieme delle caratteristiche osservabili di un individuo.

Frammento acentrico - Porzione di cromosoma senza centromero.

Fuso mitotico - È la struttura che la cellula eucariotica organizza ad ogni divisione mitotica (*vedi fase M o mitosi*) per consentire la migrazione dei cromosomi e quindi la corretta distribuzione del materiale genetico alle cellule figlie.

Gene oncosoppressore - Gene la cui perdita di funzione determina una proliferazione cellulare incontrollata.

Genotipo - Costituzione genetica di un organismo.

Genotossico - Agente o processo che altera la struttura, il contenuto informativo o la segregazione del materiale genetico (DNA) o ne inibisce transitoriamente la replicazione. Sono genotossici i mutageni e tutti gli agenti capaci di interagire in vario modo con il materiale genetico.

Linea cellulare stabilizzata - Linea di cellule hanno acquisito la capacità di sfuggire alla senescenza e continuano a proliferare indefinitamente.

Metafase - Unica fase della mitosi (*vedi fase M o mitosi*) in cui sono visibili i cromosomi nella loro morfologia caratteristica, costituiti da due cromatidi tenuti insieme a livello del centromero (*vedi centromero*).

Micronucleo - Nucleo accessorio presente nel citoplasma di una cellula, morfologicamente identico al nucleo principale, ma di dimensioni ridotte.

Mitosi - Vedi Fase M

Mutageno - Agente o processo che aumenta la frequenza di mutazioni in una popolazione di cellule o di individui.

Mutazione - Modificazione ereditabile del materiale genetico che può o meno produrre cambiamenti fenotipici.

Nucleofilo - Molecola o gruppo atomico la cui reattività chimica dipende dalla disponibilità di elettroni.

p53 - Sta per proteina 53. È una proteina soppressore (trascritta dal gene oncosoppressore p53) che viene attivata nelle cellule in risposta a stress di vario tipo quale danno al DNA, shock termico, ipossia, cambiamenti metabolici, infezioni virali, attivazione di oncogeni (*vedi oncogéne*).

Oncogéne - Forma alterata di un gene che controlla la proliferazione cellulare.

Radiomimetici - Sostanze chimiche che si comportano come le radiazioni ionizzanti provocando rotture alla molecola del DNA.

ras - Identifica il gene ras oncosoppressore (*vedi gene oncosoppressore*).

Riparazione SOS - Sistema presente nei batteri che permette al DNA di replicarsi

ugualmente anche in presenza di sequenze nucleotidiche alterate, sebbene ciò avvenga a discapito della fedeltà della replicazione (sistema di riparazione incline all'errore).

Scambi tra cromatidi fratelli (Sister Chromatid Exchange o SCE) - Sono il risultato dello scambio reciproco di materiale genetico omologo tra i due cromatidi fratelli dello stesso cromosoma.

Telofase - Ultima fase della mitosi (*vedi fase M o mitosi*) in cui scompare il fuso mitotico e si ricostituisce l'involucro nucleare attorno al materiale genetico.

Xenobiotico - Dal greco *xénos*, estraneo. Sostanza estranea all'organismo che può causare effetti biologici indesiderati.