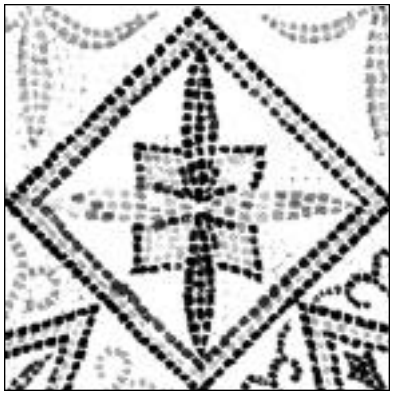
ISSN 0394 3291

Caleidoscopio Italiano



Vincenzo Aiello
Patricia Palazzi
Elisa Calzolari

Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatidici (SCE)

significato biologico e sperimentale

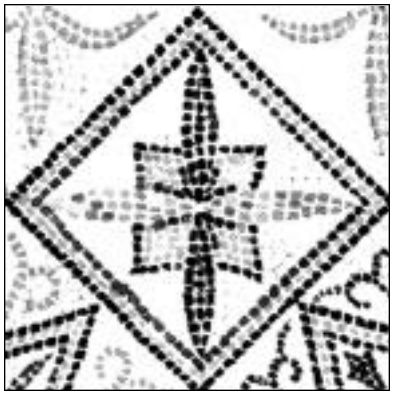
106

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

MEDICAL SYSTEMS spa

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1996

Caleidoscopio *Italiano*



Vincenzo Aiello
Patricia Palazzi
Elisa Calzolari

Istituto di Genetica Medica
Università degli Studi di Ferrara
Via Luigi Borsari, 46
44100 Ferrara

Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatidici (SCE)

significato biologico e sperimentale

106

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

MEDICAL SYSTEMS spa

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1996

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

Informazioni generali. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors.* Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

Testo. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

Frontespizio. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

Bibliografia. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi. La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati (Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.

Tabelle e figure. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse.

Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

Unità di misura. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

Abbreviazioni. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

Presentazione della monografia. Riporre le fotografie in busta separata, una copia del testo e dei grafici archiviati su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh, se MS-DOS il testo dovrà essere in formato RTF ed i grafici in formato PC.TIF o PC.Paintbrush.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spedite al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia.

L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Editoriale

La genetica ha assunto un ruolo centrale nella moderna biologia ed ancora dobbiamo aspettarci dei contributi enormi nel campo della medicina da questa sua branca.

I processi biologici vengono oggi analizzati a livelli impensabili solo due decadi fa e, da calcoli confidenziali, si ritiene che nei prossimi cinque-dieci anni potrà essere nota la struttura dell'intero genoma umano.

Più volte in questa collana ci siamo occupati di argomenti che sono entrati ormai nel bagaglio comune quali la tecnologia del DNA ricombinante, l'ingegneria genetica, il clonaggio dei geni, la reazione polimerasica a catena etc.

In questa monografia ci occupiamo di una particolare test di citogenetica che è conosciuto con il termine di sister chromatid exchange (SCE).

La replicazione del DNA, che avviene poco prima della divisione cellulare, comporta la formazione per ciascun cromosoma di una copia esatta di se stesso. Le due copie sono tenute insieme in corrispondenza del centromero ed il cromosoma, in questa configurazione, si dice che sia composto da due cromatidi. In questa fase si verifica la rottura del DNA, talvolta spontaneamente o più spesso per influenze esterne alla cellula, con conseguente processo di autoriparazione durante il quale, talvolta, porzioni uguali dei due cromatidi opposti (sister chromatids) del cromosoma scambiano la loro posizione. Tecniche speciali di colorazione ci permettono di colorare un cromatide scuro e l'altro chiaro evidenziando ogni scambio che si verifica.

Il SCE è un indicatore sensibile della esposizione della cellula a sostanze pericolose anche se non è possibile individuare il danno che può essersi verificato durante la replicazione del DNA, prima che le cellule vengano messe in coltura.

Il SCE, insieme al test del micronucleo della rottura del cromosoma (aberrazioni) ed al G-banding, rappresenta quindi uno dei test di citogenetica particolarmente utili quando è importante determinare se c'é stata una esposizione ad un agente potenzialmente carcinogenico. Infatti la frequenza dei SCE è un indicatore sensibile di lesioni del cromosoma ed è quindi ampiamente utilizzato in tossicologia genetica.

Per avere un'idea della potenziale utilità di questo test basti pensare che studi fatti sulla frequenza del SCE nei linfociti in una corte di 33 civili obbligati dalle autorità militari sovietiche ad andare a Chernobyl ed a partecipare alle operazioni di pulizia dopo il disastro del 1986 hanno dimostrato una frequenza media di SCE, rispetto ad

un gruppo di controllo, significativamente superiore anche a distanza di 6-8 anni dalla esposizione, confermando così delle modificazioni citogenetiche ancora significative a distanza di tanti anni. Questo stesso tipi di risultati sono stati registrati nei lavoratori a contatto con i pesticidi ed in tante altre condizioni.

In questa monografia vengono analizzate tutti gli sviluppi metodologici del SCE a partire dalla prima descrizione fatta nel 1957 da Taylor e dai suoi colleghi, utilizzando come marcatore la timidina triziata, sino alle tecniche più recenti che utilizzano la 5 bromodesossiuridina ed un colorante fluorescente (Hoechst 33258); vengono ancora discussi tutti i fattori che influenzano la formazione del SCE fornendo un quadro che difficilmente è reperibile nella letteratura e pertanto può costituire un utile strumento di aggiornamento in un campo che richiede la massima attenzione per non rimanere travolti e superati dai rapidi mutamenti.

Gli Autori hanno ovviamente una conoscenza diretta della metodica e pertanto possono rappresentare anche un punto di riferimento per tutti coloro che vorranno ulteriormente approfondire questi temi.

La Prof.ssa Elisa Calzolari, Professore Ordinario della Cattedra di Genetica Umana dell'Università degli Studi di Ferrara, è responsabile del Servizio di Citogenetica dell'Istituto di Genetica Medica dell'Università degli Studi di Ferrara. E' inoltre responsabile del Gruppo IMER (gruppo di Studio sulle Malformazioni Congenite dell'Emilia Romagna).

Dott. Vincenzo Aiello è Biologo specializzato in Genetica Medica e lavora come tecnico di laboratorio nel Servizio di Citogenetica dell'Istituto di Genetica Medica dell'Università degli Studi di Ferrara.

La signora Patricia Palazzi è tecnico nel Servizio di Citogenetica dell'Istituto di Genetica Medica dell'Università di Ferrara.

Siamo sicure che questa monografia permetterà di aprire nuove finestre sullo sconfinato campo della conoscenza scientifica.

Sergio Rassu

Introduzione

Dopo incorporazione di 5-bromodeossiuridina (BrdU) nel terreno di coltura per almeno due cicli cellulari e una particolare colorazione dei preparati citogenetici, si ottengono cromosomi che presentano i due cromatidi di diversa colorazione, questa struttura dei cromosomi è detta "Sister Chromatid Differenzation" (SCD) (Fig. 1a).

I Sister Chromatid Exchanges (SCE), rappresentano l'interscambio del DNA prodotto di replicazione tra i loci omologhi del cromosoma. L'SCE è uno scambio simmetrico tra un cromatide duplicato (Fig. 1 b-c).

Lo studio dei Sister Chromatid Exchanges coinvolge il campo della citogenetica morfologica, della mutagenesi e delle patologie legate a instabilità del genoma.

Il significato biologico degli SCE è incerto: essi si verificano normalmente nelle cellule, ma la loro frequenza varia in rapporto a fattori esogeni ed endogeni e possono essere usati come indice aspecifico di danno cellulare, in condizioni sperimentali e cliniche.

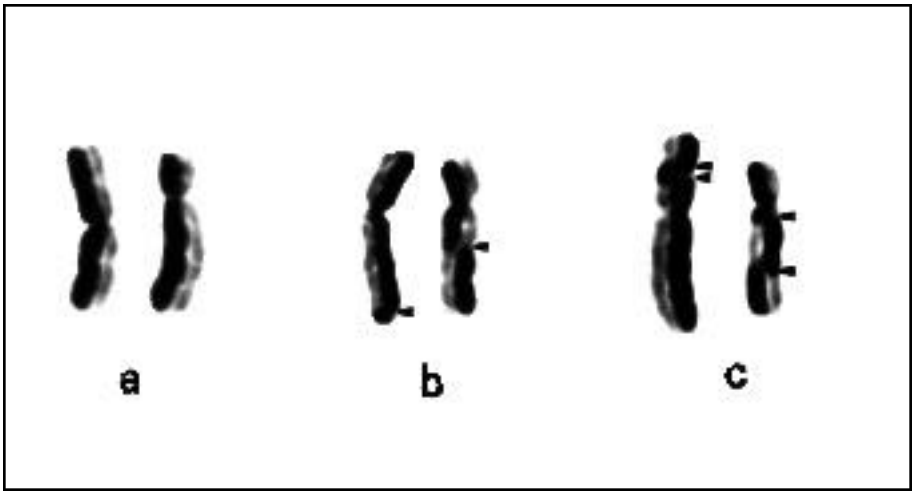


Figura 1. Alcuni cromosomi che evidenziano SCD (a) e SCE con singolo scambio (b) e con doppio scambio (c) dopo trattamento con Hoechst 33258 e Giemsa (Da Verma R.S. e Babu A. 1995).

Sister Chromatid Differentiation

1. Replicazione semiconservativa del DNA

Il DNA è costituito da due filamenti, uno considerato positivo (+) e l'altro negativo (-), strutturalmente complementari nel senso che le basi puriniche e pirimidiniche sono disposte sui due filamenti in modo tale che vi è sempre corrispondenza fra una base di adenina (A) su un filamento (+) ed una base di timidina (T) sull'altro (-) e viceversa, ed analoga corrispondenza tra le basi di citosina (C) e guanina (G).

Durante la sintesi di nuovo DNA (replicazione cellulare), i due filamenti si separano e su ciascuno di essi si ricostruisce un nuovo filamento complementare (replicazione semiconservativa).

La precisione dei legami idrogeno che si stabiliscono tra DNA stampo e nucleotidi che vengono via via aggiunti, pone delle restrizioni sul tipo di analoghi che possono essere sostituiti per un particolare nucleotide. Basi a struttura simile a quella delle quattro basi normali (A, T, G, C) possono inserirsi selettivamente al posto di ciascuna di esse e risultare alla fine incorporate nei filamenti di DNA di nuova sintesi (fig. 2).

Questo meccanismo è di facile comprensione e spiegazione nel caso della timidina marcata con trizio (3H), perché questa ha una struttura chimica identica alla timidina normale.

La 5-bromocitosina o la 5-metilcitosina possono essere usate per sostituire il deossiribonucleotide della citosina. In modo analogo l'uracile, il 5-bromouracile o il 5-fluorouracile possono sostituire la timina e l'ipoxantina può sostituire la guanina. La sostituzione della timina con il suo analogo 5-bromouracile non dà nessun effetto sulla sintesi in vitro di DNA. La morfologia molecolare del 5-bromouracile, è simile a quella della timina, perché un atomo di bromo prende il posto di un gruppo metilico (-CH3) nell'anello pirimidinico in posizione 5, perciò la 5-BrdU (la Bromodeossiuridina è il deossiriboside del 5-Bromouracile) può inserirsi sul nuovo filamento, cioè di fronte alla adenina situata nel filamento opposto (fig.3).

L'inserimento della BrdU non interferisce sensibilmente sui successivi cicli di replicazione, che avvengono normalmente con la incorporazione inversa corrispondente di adenina e quindi con apparente normale proseguimento della attività cellulare. Ci riferiremo da ora in poi solo alla BrdU, normalmente utilizzata negli studi presentati.

Per le caratteristiche di replicazione semiconservativa del DNA, dopo un solo ciclo cellulare in presenza di BrdU i due cromatidi costituenti il cromosoma metafasico avranno ciascuno un filamento nuovo nel quale è stato incorporato l'analogo della timidina ad un filamento originario vecchio normale.

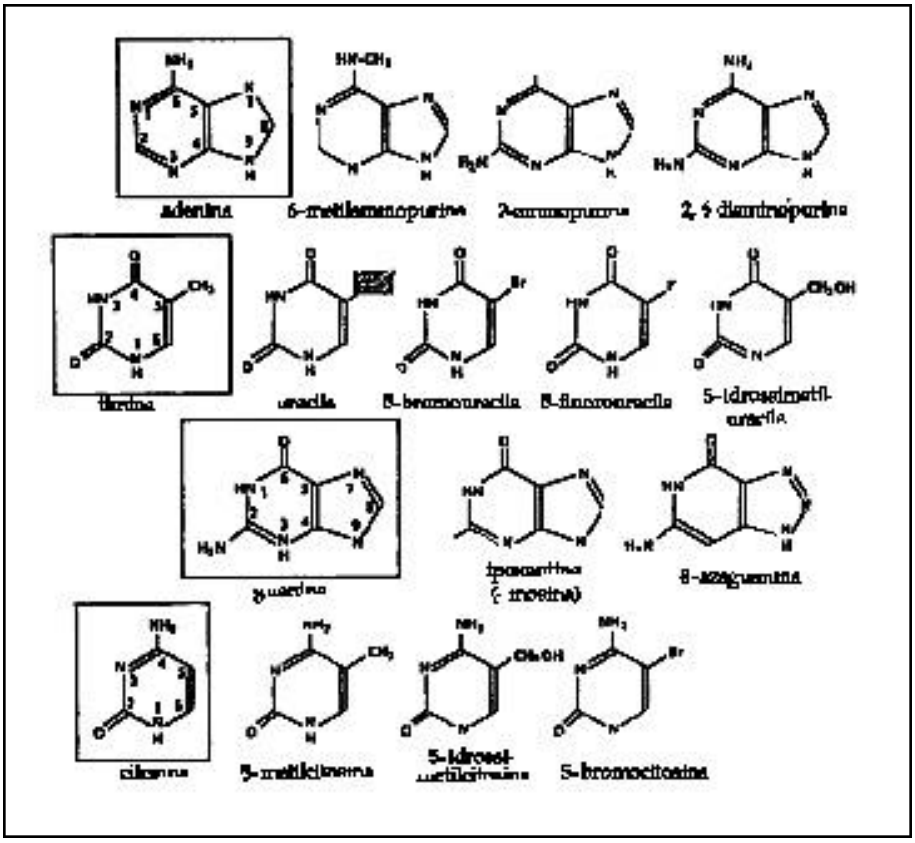


Figura 2. Basi che ricorrono nel DNA e loro analoghi. Le aree colorate indicano le caratteristiche degli analoghi delle basi (Da Strickbergher MW 3 ed.).

Dopo un ulteriore ciclo sempre in presenza dello stesso nucleotide (BrdU), tre filamenti su quattro saranno sostituiti (fig. 4), cioè uno solo dei due cromatidi contiene ancora un filamento di DNA originario normale.

In altre parole il cromosoma metafasico sarà formato da un cromatidio monosostituito da BrdU e da un altro bisostituito.

Le cellule, coltivate sempre in presenza di BrdU, che hanno superato due cicli cellulari e si trovano in metafase dopo il terzo o quarto ciclo, avranno un numero sempre minore di cromosomi con un cromatidio monosostituito, mentre la maggior parte dei cromosomi avranno cromatidi bisostituiti: in teoria a partire dal terzo ciclo in poi, il numero dei cromosomi che contengono un filamento di DNA originario dovrebbe dimezzare ad ogni divisione successiva (fig. 5-6).

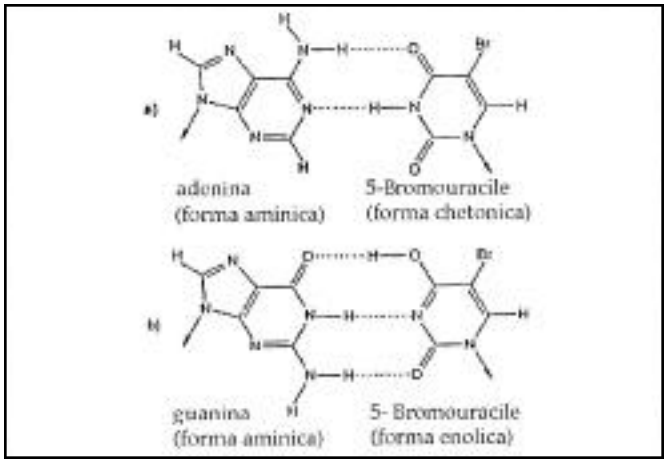


Figura 3. Possibili appaiamenti del 5-Bromouracile. a) nella forma chetonica il 5-Bromouracile si appaia con l'adenina; questo appaiamento non produce mutazioni. b) nella rara forma enolica il 5-Bromouracile si appaia con la guanina, dando una mutazione del tipo transizione.

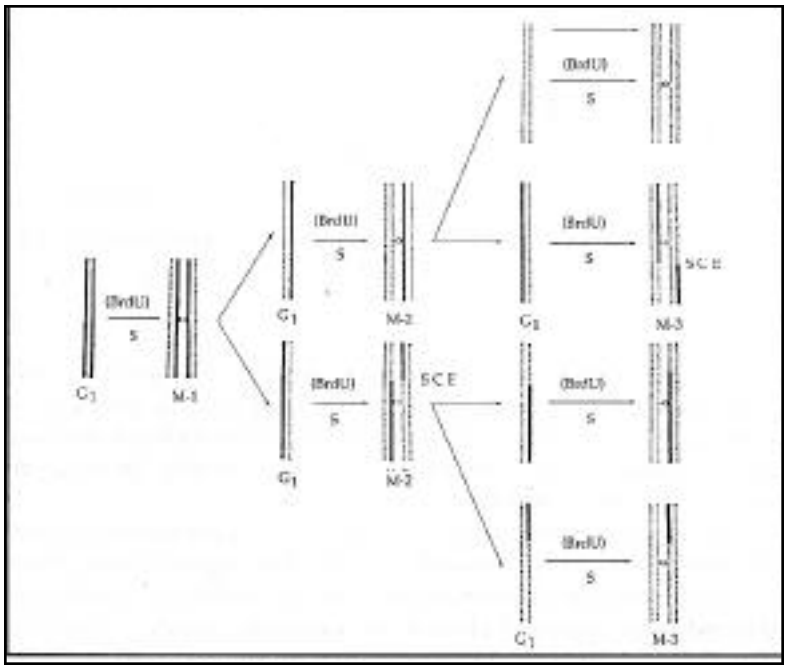


Figura 4. Diagramma illustrativo del meccanismo di formazione di sister chromatid differenzation (SCD) e dei sister chromatid exchanges (SCE). Il DNA parentale è indicato con tratti marcati, quello neoformato che ha incorporato la BrdU è indicato con tratteggi. (Da Verma R.S. e Babu A. 1995).

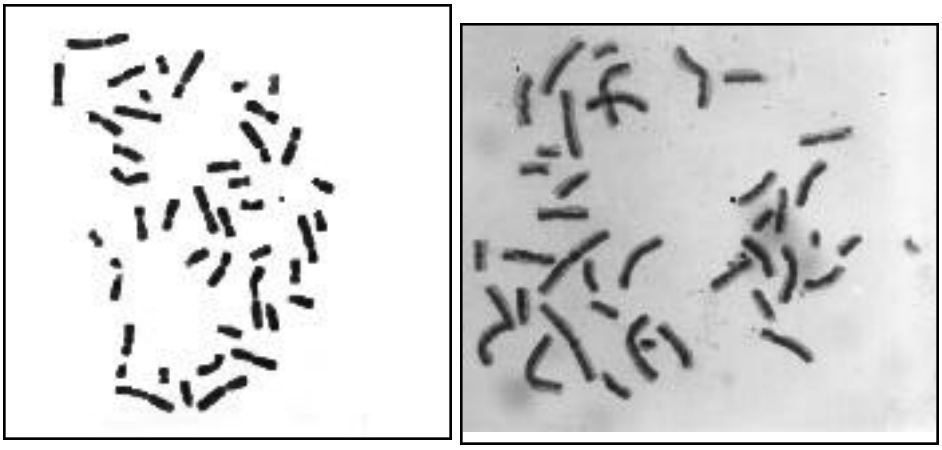


Figure 5 A e 5 B. Piastre metafasiche dopo un ciclo cellulare (a) e dopo due cicli (b) in presenza di BrdU.

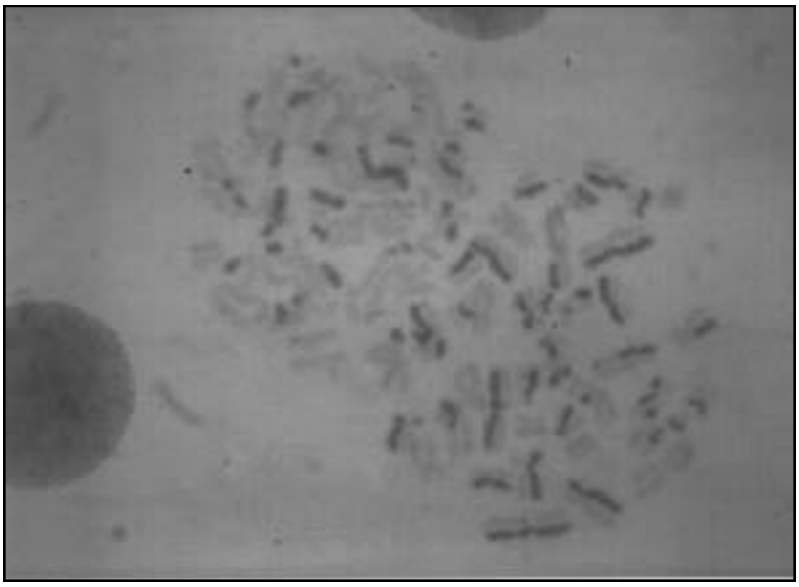


Figura 6. Due piastre metafisiche ravvicinate in alto dopo tre cicli cellulari con incorporazione di BrdU, in basso dopo quattro cicli.

2. Modalità di evidenziazione della Sister Chromatid Differentiation (SCD)

Il primo metodo usato per evidenziare la Sister Chromatid Differentiation era basato sulla utilizzazione della timidina triziata (3H) (fig. 7), ma attualmente si preferiscono metodi basati sull'impiego di nucleotidi alogenati come la BrdU. La osservazione degli effetti della BrdU sulla colorazione differenziale dei cromosomi è stata casuale durante le indagini per individuare gli effetti di questo nucleotide sulla integrità e sulla condensazione dei cromosomi.

Durante una serie di studi diretti a valutare gli effetti di agenti chimici, tra cui la BrdU, su cromosomi di topo Hung (20) notò che cromosomi in metafase preparati dopo aver incorporato per due cicli successivi BrdU presentavano i cromatidi fratelli colorati in modo differente.

Zakharof ed Egolina (50), poi Palmer (35) hanno osservato che le cellule esposte ad alte concentrazioni di BrdU durante la fase terminale della sintesi del DNA, avevano un difetto di condensazione delle regioni cromosomiche a replicazione tardiva (8-52).

Zakharov ed Egolina (51) hanno inoltre mostrato che questo nucleotide, incorporato alla fine della fase S di due cicli cellulari successivi, dava con il Giemsa una colorazione diversa dei due cromatidi fratelli nei cromosomi a replicazione tardiva bloccati in metafase. In contrasto a quanto sopra detto, se si esponevano le cellule alla BrdU per ciclo cellulare si aveva uno scarso effetto sulla morfologia dei cromosomi.

Un tentativo per trovare, mediante l'impiego della fluorescenza, una alternativa all'autoradiografia (con timidina triziata) per individuare il DNA di nuova sintesi, è stato condotto da Latt (26). Egli ha esaminato la capacità della BrdU di smorzare la intensità della fluorescenza dei fluorocromi legati al DNA. Dopo l'incorporazione di BrdU da parte delle cellule in coltura per due cicli replicativi e l'allestimento dei vetrini, fu osservato che utilizzando per la colorazione il fluorocromo Bisbenzimide (Hoechst 33258) i cromatidi bisostituiti contenenti BrdU, dimostravano una fluorescenza più debole rispetto a quelli monosostituiti. L'ipotesi di spiegare questo fenomeno, è che la BrdU può attenuare l'intensità della fluorescenza per effetto della presenza di un atomo pesante (cloro).

Nei vari esperimenti condotti da Latt oltre all'Hoechst 33258, sono stati usati altri coloranti fluorescenti come l'arancio di acridina, la proflavina, l'etidium e la chinacrina, ma l'Hoechst 33258 ha dato i risultati più evidenti.

Un miglioramento tecnico per la SCD si è avuto grazie alla introduzione della sovracolorazione con Giemsa dopo l'Hoechst 33258 (37).

L'introduzione di questa metodica ha portato vantaggi notevoli, perché questi studi possono essere eseguiti con attrezzature semplici di microscopia in campo chiaro (luce trasmessa): i preparati possono essere osservati a lungo senza deterioramento delle immagini e conservati senza difficoltà.

Sister Chromatid Exchanges

I "Sister Chromatid Exchanges (SCE)" rappresentano l'interscambio del DNA di replicazione prodotto in loci cromosomici apparentemente corrispondenti. Questi scambi presumibilmente coinvolgono rottura e riunione del DNA e l'analisi degli SCE offre una opportunità per la dimostrazione citologica degli scambi del DNA.

I Sister Chromatid Exchanges nelle cellule somatiche, sono stati dimostrati per la prima volta nel 1957 da J.H. Taylor e coll.(42) (fig. 7). La scoperta è stata fatta mediante lo stesso tipo di esperimenti condotti per la dimostrazione della semiconservatività del DNA. Le cellule sono state coltivate per due cicli di sintesi in terreno contenente timidina triziata (3H) e per successivi cicli in terreno senza trizio; la autoradiografia delle metafasi ha mostrato non solo che un cromatidio era marcato e l'altro no, ma anche che erano chiaramente riconoscibili scambi tra cromatidi fratelli.

Attualmente tutti gli studi sugli SCE si basano su metodi di sovracolorazione con Giemsa, come descritto precedentemente (SCD).

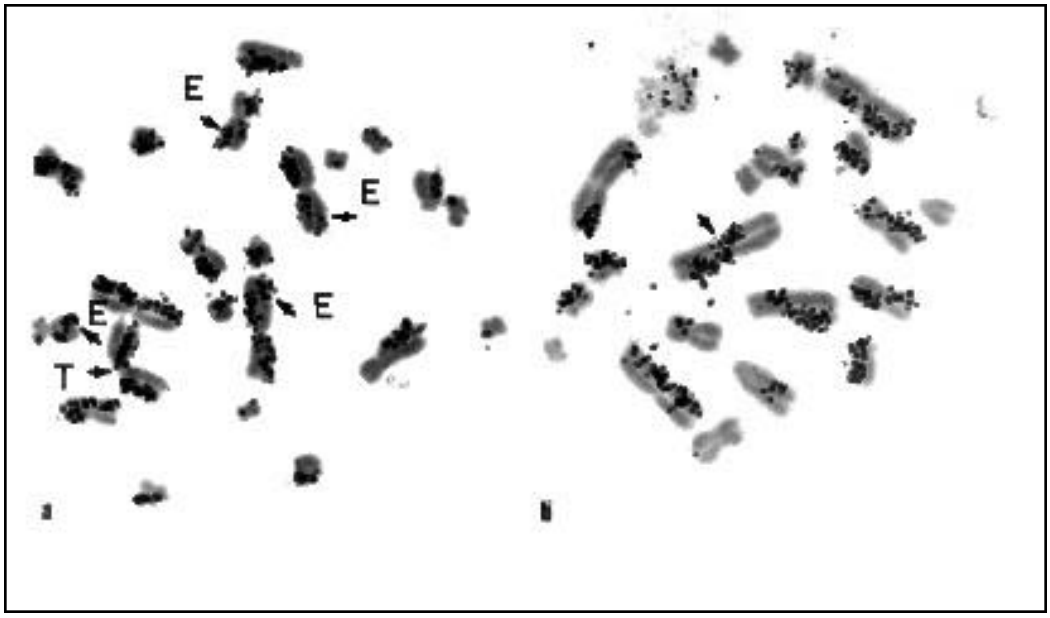


Figura 7. Piastre metafisiche con tracce di marcatura radioattiva con timidina triziale. (E) Punti di scambio; (T) posizione del centromero.

Formazione degli SCE

La formazione di SCE è strettamente collegata con la riparazione del DNA e coinvolge una classe di enzimi noti come "Topoisomerasi".

Questi enzimi consentono di superare gli ostacoli "topologici" che sono collegati al grado di avvolgimento e di superavvolgimento delle catene di DNA nel processo di duplicazione attraverso tre momenti:

1. Taglio di uno o di entrambi i filamenti di DNA ("cleavage" e "incision" o "nick").
2. Passaggio del DNA attraverso il taglio.
3. Risaldatura ("ligation") dei capi del filamento di DNA.

Le Topoisomerasi possono tagliare un singolo filamento (Topoisomerasi I) (fig. 8), oppure entrambi i filamenti di DNA (Topoisomerasi II) (fig. 9).

I dettagli di meccanica molecolare dei vari modelli proposti da Pommier, Ischii e Bender, Kato e Cleaver, sono stati discussi da Dillehay e coll. (11), ma molti aspetti rimangono ancora da chiarire.

Quali che siano i meccanismi di formazione degli SCE, il risultato è essenzialmente quello di avere una continuità fra tratti di filamenti di DNA di vecchia e di nuova sintesi.

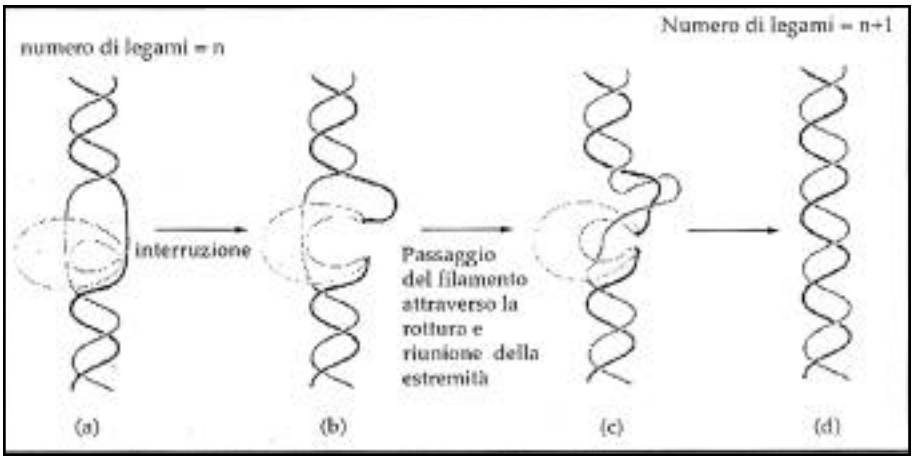


Figura 8. Il meccanismo di azione delle topoisomerasi è procariotica. (a) L'enzima si lega al DNA svolgendo la doppia elica. (b) Esso successiva - mente interrompe un filamento e impedisce la libera rotazione della elica rimanendo legato ad ogni estremità interrotta. (c) L'enzima fa passare il filamento attraverso la rottura e lega le estremità interrotte aumentando di fatto di uno il numero di legami del DNA. (d) L'enzima si stacca e i filamenti si rinaturano, lasciando il DNA con un giro di superelica in meno. (da Watson J.D. e coll. 1969 4 ed.).

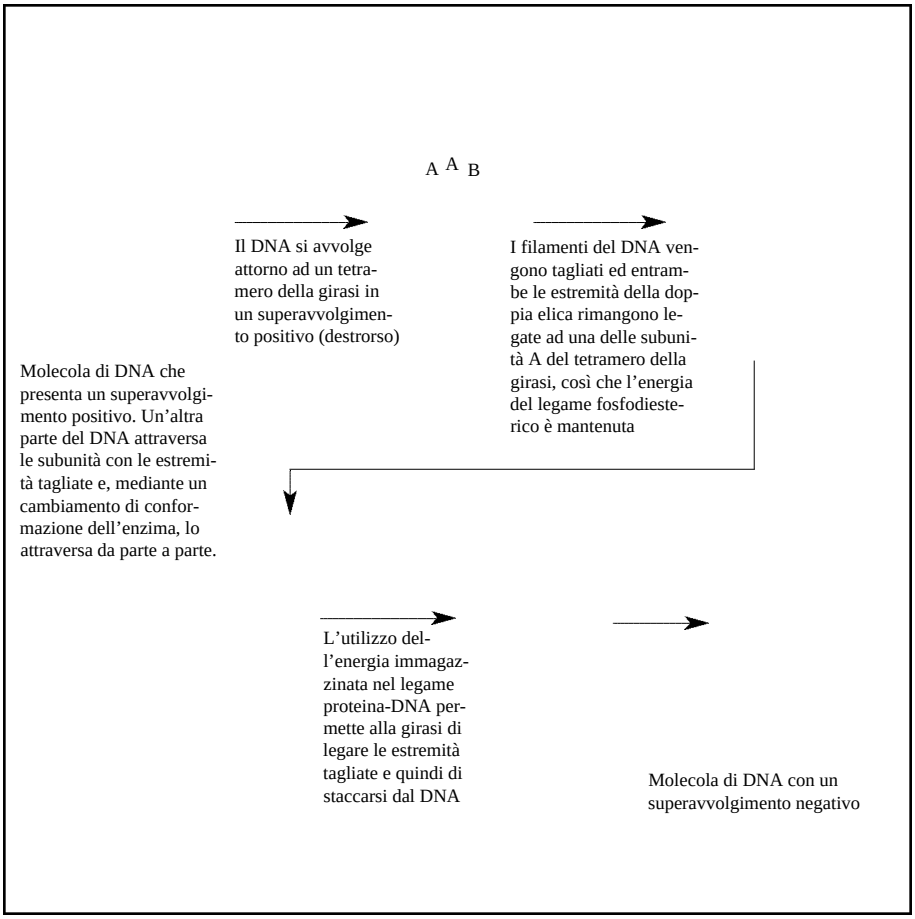


Figura 9. Un possibile meccanismo d'azione per la Topoisomerasi II procariotica (Girasi). Per semplicità, il DNA di partenza è rappresentato con un solo superavvolgimento positivo attorno all'enzima. Di fatto, il DNA di partenza può avere superavvolgimenti sia negativi che positivi. L'azione della Topoisomerasi II consiste nel diminuire il numero di legame di due, un cambiamento che, in questo caso, è rappresentato dalla differenza tra un giro di superavvolgimento positivo ed uno negativo. (Da Watson J.D. e coll. 1989 4 ed.).

SCE e crossing-over mitotico

Potrebbero esistere correlazioni fra SCE e il fenomeno molto più raro del crossing-over mitotico (oltre che con la stessa meiosi).

Nelle cellule somatiche in mitosi, figure interpretabili come analoghe a chiasmi fra cromosomi omologhi (paterno-materno analoghi a quelli osservati nella meiosi) sono osservabili raramente (0,1-1 su 1000 metafasi) in condizioni normali, ma sono frequenti nella sindrome di Bloom (5-150 su 1000 metafasi) (fig. 10).

Vi è una sostanziale differenza fra SCE e crossing-over mitotico, in quanto nelle SCE lo scambio avviene fra cromatidi identici, quindi, in linea di principio, il messaggio informativo genetico rimane invariato, mentre dal crossing-over mitotico possono originare omozigosi per geni recessivi scambiati, con possibilità di espressione neoplastica.

Peraltro i due fenomeni sono collegati dal fatto di coinvolgere rotture e riunioni fra filamenti di DNA e dal fatto che sono entrambi aumentati di frequenza nella sindrome di Bloom.

Va ricordato anche che gli SCE possono avvenire in posizioni non esattamente corrispondenti e perciò dare origine ad amplificazione o delezione di geni sui rispettivi cromatidi (fig. 11).

La variazione della regione eterocromatica (q distale) del cromosoma Y potrebbe derivare da SCE irregolari.

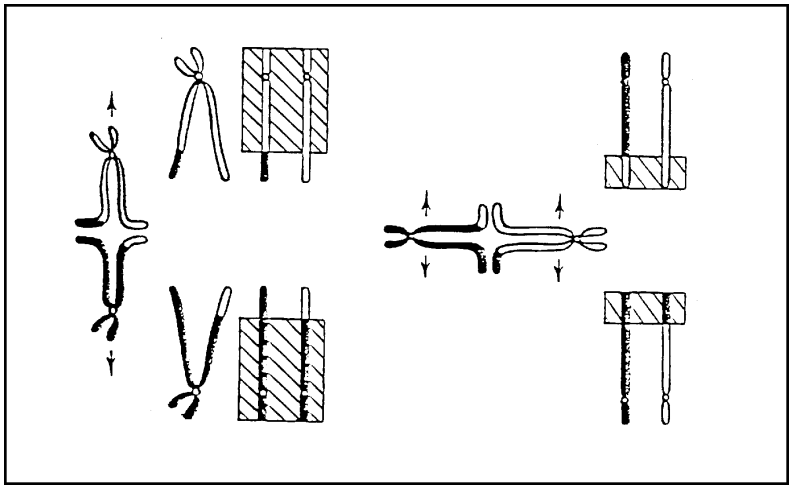


Figura 10. Segregazione dopo crossing-over in bivalenti meiotici (rappresentazione di sinistra) e un chiasma mitotico (rappresentazione di destra). Nella segregazione meiotica i cromatidi distali al chiasma non sono fratelli, nella segregazione mitotica sono fratelli. (Da Therman E. 1986 2; ed.).

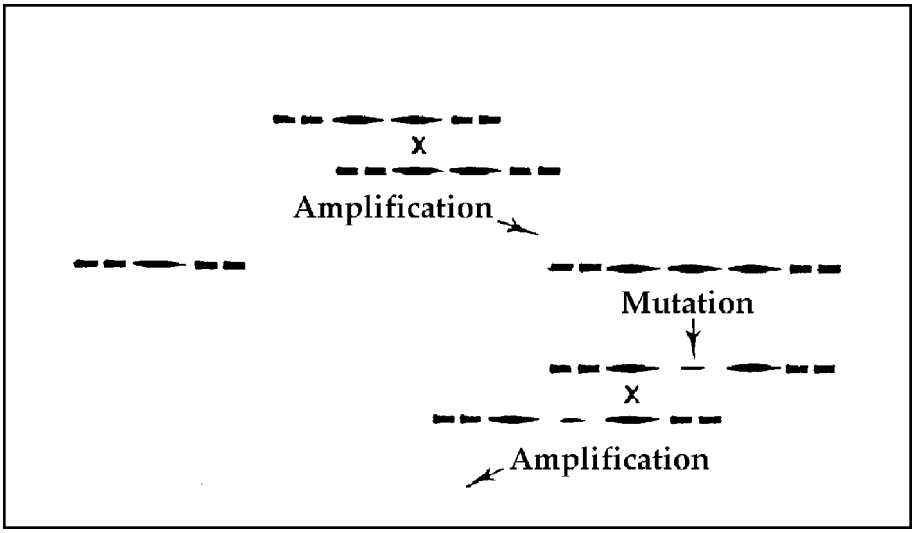


Figura 11. Amplificazione e riduzione di segmenti cromosomici attraverso un crossing-over ineguale. (Da Therman E. 1986 2 ed).

Fattori che influenzano la formazione degli SCE

L'applicazione delle nuove metodiche per la evidenziazione degli SCE, hanno permesso ai ricercatori di utilizzare il loro studio in vari campi (tab. 1).

Gli SCE sono stati trovati in tutti gli organismi in cui si è applicata questa metodica; in numerosi mammiferi compreso l'uomo, in diverse varietà di uccelli, nei pesci, negli insetti ed anche nelle piante (39). La maggior parte degli studi sugli SCE sono stati condotti in vitro, ma studi in vivo sono stati fatti su midollo osseo, milza, fegato rigenerato e spermatogoni di mammifero (22).

Che i Sister Chromatid Exchanges avvengano spontaneamente è dimostrato dal comportamento dei cromosomi ad anello: essi hanno aspetto variabile per dimensioni e per numero di centromeri, talvolta con forme multiple concatenate e questa variabilità è spiegabile con SCE che avvengono in fase di sintesi prima della mitosi (14).

Il miglioramento delle metodiche per l'analisi cromosomica ha permesso di determinare le regioni lungo i vari cromosomi in cui i Sister Chromatid Exchanges sono più frequenti.

La distribuzione degli SCE sui vari cromosomi non è casuale, ed è differente da quella delle rotture cromosomiche. Sembra che i cromosomi dei gruppi A e B abbiano più scambi cromatidici di quelli che ci si attenderebbe in base alla lunghezza, mentre un numero minore si formano sui cromosomi dei gruppi E, F e G (43).

Scambi mitotici

a. SCE:
- Analizzare la polarità dei cromatidi.
- Comprendere la segregazione dei cromosomi omologhi.
- Determinare gli interscambi "Punti caldi o hotspots".
- Risolvere domande riguardo le isomarcature.
- Induzione degli SCE per la determinazione di mutageni e carcinogeni sia in vivo che *in vitro.*
- Caratterizzare e differenziare le malattie derivate da fragilità cromosomica.

b. Scambi tra cromosomi:
- Verificare l'associazione tra ricombinazione somatica e la formazione di figure quadriradiali.

Scambi meiotici (scambi tra Omologhi)

- Dimostrazione diretta di crossing over.
- Individuazione mediante alta risoluzione di punti di scambio.

Tabella 1. Alcuni usi degli SCE mediante la determinazione con BrdU.

Molti studi sugli SCE hanno confermato che, a livello delle regioni di così detta eterocromatina costitutiva (bande-C positive) la frequenza degli scambi cromatidici è minore rispetto alle regioni di eucromatina, comunque sembra che le regioni di confine tra eterocromatina ed eucromatina, cioè i bordi che si ottengono con il bandeggio-C, siano ad alta frequenza diSCE (2).

Nei cromosomi umani, gli SCE si formano preferibilmente a livello delle bande Q-negative o nei punti di giunzione tra le bande Q-negative e Q-positive (fig. 12). Da studi condotti da S.A. Latt e L.A. Juergens (29), sono stati osservati degli "hot spots" o punti caldi ad alta frequenza di SCE. Risulta tuttavia difficile disegnare una mappa dettagliata del cariotipo umano con i punti caldi per gli scambi cromatidici, visto che numerosi sono i lavori al riguardo, ma non sempre viene trovata coincidenza tra questi hot spots. Alcuni di questi punti sono: 1q25, lq31, 2p21, 4q31, 6q21, 8q13, 18q21, Xq22 e Xq26 (fig. 13) (29). Le costrizioni secondarie dei cromosomi 1, 9 e 16 sembra che non siano zone ad alta frequenza. Ulteriori studi condotti su cromosomi di muntjac indiano, di canguro e di criceto, hanno messo in evidenza una maggiore frequenza di SCE nei punti di unione tra le regioni di eterocromatina e dell'eucromatina (4-5-19).

Lin e Alfi (31) dopo aver trattato i cromosomi di topo con BrdU e mitomicina-C, hanno osservato un aumento di scambi cromatidici nelle regioni vicino ai centromeri rispetto al resto delle braccia del cromosoma.

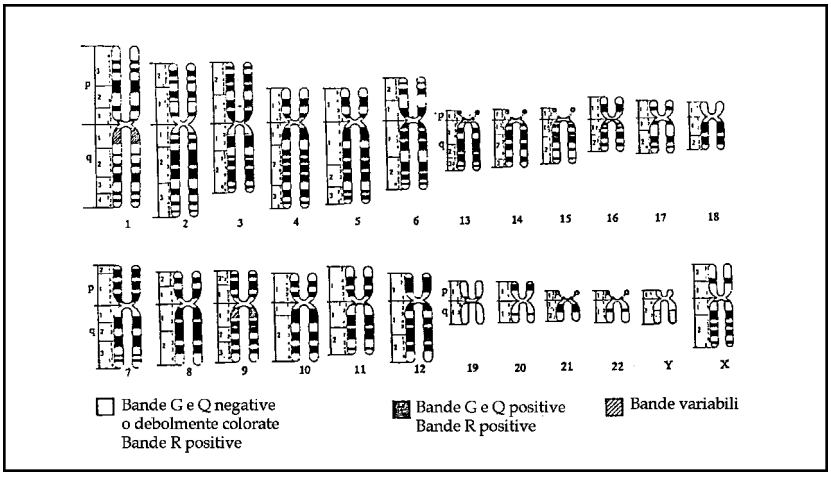


Figura 12. Rappresentazione scematica dei cromosomi umani con il quadro del bandeggio e la numerazione secondo la conferenza di Parigi. Ripreso dalla conferenza di Parigi (1971).

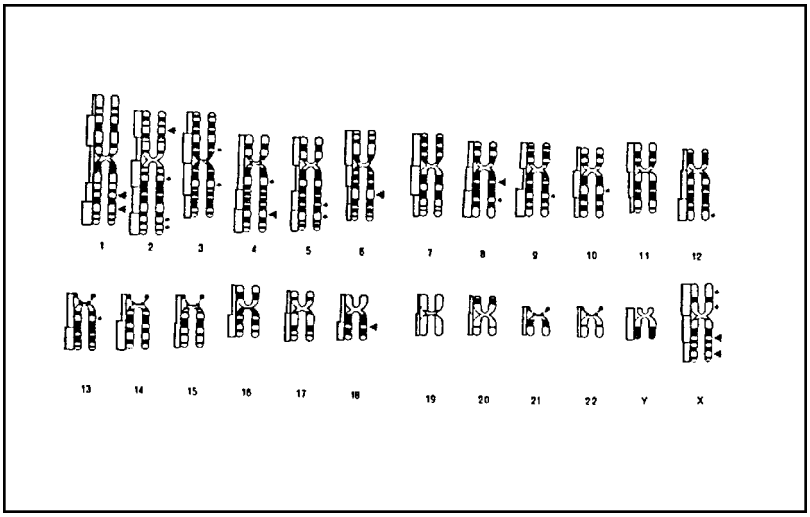


Figura 13. Distribuzione dei Sister Cromatid Exchanges nei cromosomi umani.

Un aumento sensibile è stato inoltre riscontrato nei cromosomi umani dopo allungamento con la metodica usata da Yunis (48). Anche un eccesso di BrdU (come di timidina triziata) oltre a consentire la evidenziazione di SCD e conseguentemente di SCE, può indurre questi ultimi.

Adolph e coll. (1) hanno osservato che i siti di formazione dei Sister Chromatid Exchanges, sono in relazione al DNA associato alle proteine strutturali dei cromosomi e secondo Rawin e coll. (38), questo DNA contiene sequenze ripetute che producono caratteristici frammenti dopo digestione con endonucleasi di restrizione.

Risulta estremamente difficile trovare, nelle varie cellule in studio, il valore medio "normale" degli SCE per metafase. Nelle cellule di criceto cinese il valore medio stimato di SCE va da 2,5 a 5 per cellule dopo due cicli cellulari (47), mentre nel midollo osseo di topo il valore va da 1,5 a 2 per ogni cellula.

Il numero degli SCE nelle cellule normali umane varia nei diversi tipi di cellule esaminate, il range per cellula va da 2 a 20 con una frequenza media di SCE compreso tra 5 e 8 (6). Il valore medio di SCE non differisce tra i sessi, ma può essere influenzato dall'età. la frequenza massima di scambi cromatidici è osservata tra l'età di 30 e 40 anni (9).

Tra i fattori che possono, influenzare gli scambi cromatidici vi sono i mutageni, i clastogeni, il fumo e i fattori genetici.

a . Mutageni e clastogeni

Mutazioni spontanee si verificano in tutti gli organismi ad una frequenza bassa (1 su 2000 gameti nell'uomo) (40), ma misurabile, dipendente presumibilmente dal tasso di errore intrinseco al processo di duplicazione e di trasformazione del genoma. I "mutageni" facilitano il verificarsi di tali errori, i "clastogeni", una sottoclasse dei mutageni, facilitano le rotture cromosomiche. Tra le applicazioni degli SCE, una delle più diffuse riguarda la valutazione dell'impatto di mutageni e di clastogeni sui cromosomi umani. Se si esaminano le cellule sottoposte a mutageni e a clastogeni, la frequenza di SCE è molto spesso aumentata. Nella figura 14 sono riassunti i dati relativi alla induzione di SCE da parte di vari mutageni, da cui appare evidente che la mitomicina-C ed il N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) sono particolarmente efficaci da questo punto di vista.

La capacità di indurre Sister Chromatid Exchanges è correlata con la mutagenicità generale di una data sostanza, mentre, piuttosto sorprendentemente, la formazione di SCE non è molto correlata con la capacità ad agire come clastogeno.

La capacità che hanno gli agenti alchilanti e le proflavine ad indurre gli SCE è stata per prima dimostrata da Kato (24), mediante l'uso dell'autoradiografia.

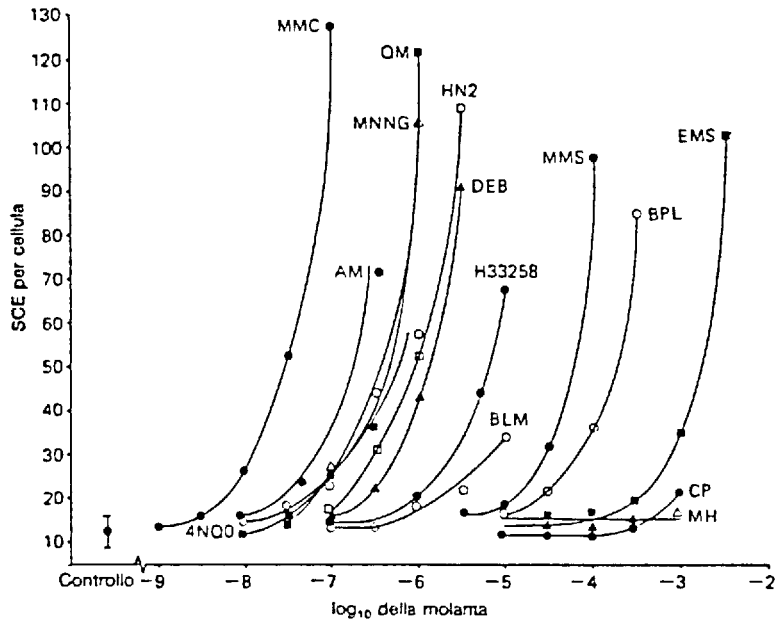


Figura 14. Curve dose-effetto per la frequenza di SCE in cellule CHO (ovaio di hamster cinese) espressa in funzione del log della concentrazione iniziale. MMC mitomicina-C; AM adriamicina: MNNG N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidine QM mostarda di quinacrina; 4NQO 4-nitrochinolina-1-ossido; HN2 mostarda azotata; DEB diepossibutano; H33258 Hoechst 33258; BLM bleomicina; MMS, metilmetansulfonato: BPL B-propiolattone; EMS etilmetansulfonato; CP ciclofosfamide; MH idrazide maleica. (I)e Strickberger M.W. 3 ed 1992).

Si è osservato che basse dosi di agenti alchilanti, quali la mitomicina-C o la mostarda azotata, influiscono notevolmente sugli scambi cromatidici aumentandone il numero a concentrazioni molto al di sotto di quelle che portano alla formazione di rotture cromosomiche (27).

Numerosi studi successivi hanno confermato queste osservazioni e sono state estese su altri agenti noti per danneggiare i cromosomi direttamente o dopo attivazione metabolica (30).

Tra i numerosi agenti capaci di indurre gli scambi cromatidici, sono da considerare oltre ai mutageni ed ai clastogeni, anche i carcinogeni. Mediante queste prove si è dedotto che l'analisi degli SCE può essere utilizzata per controllare l'effetto di questi agenti sulle cellule in vitro, ma anche in vivo (36) (tab. 2-3).

Vari altri agenti noti come causa di danni genetici, sono relativamente inefficienti nel provocare aumento di SCE (raggi-X, acrilamide monomerica, bleomicina), mentre hanno capacità di indurre rotture cromosomiche e/o riarrangiamenti (tab. 4).

Acetaldeide	Ciclofosfamide
N-Acetilaminofluorene	N-Dibutilamina
N-Acetossiacetinoaminofluorene	Dibubutilnitrosamina
N-Idrossiacetilaminofluorene	Difenile
Aminofluorene	Etilmetansolfato
4-Aminochinolina-1-assido	33258 Hoechst
Anilina	Mitomicina C
Benzopirene	Proflavina
Betapropiolactone	Mostarda di chinacrina
Busulfan	Saccarina
5-Bromodeossiuridina	Deossitimidina triziata
N-n-Butilurea	Raggi UV della lunghezza d'onda 254 nm
N-n-Butil-N-nitrosourea	Raggi-X
Clorambucil	Virus (SV-40)
Clorpropamide	

Tabella 2. Agenti capaci di indurre SCE.

Acridina orange	Deossicitidina
Acrilamide	Deossitimidina
Antracene	Fenantrene
Arsenico	Potassio metabisolfito
Bleomicina	Pirene
Butilbutanolamina	Piridina
Butilidrossianisolo	Sodio benzosto
Caffeina	Virus (Vaccini)
Citosina arabinoside	

Tabella 3. Agenti capaci di indurre debolmente gli SCE.

Acetone
Alcoli:
Butanolo
Etanolo
Metanolo
Propanolo
Aminopiridina
Bilirubina
Dimetilsulfossido
8-Etossicaffeina
Glicole etilene
Idrossiurea
Ozono Penicillina G
Chinolina
Soluzioni saline:
Sodio acetato
Soluzione salina di Hanks
0.3 M NaCl + 0.1 M citrato
0.2 fosfato + 0.1 M citrato
Sodio deidroacetato
Streptomicina
Tetraciclina

Tabella 4. Agenti che non provocano SCE.

La combinazione degli SCE e delle aberrazioni cromosomiche, quando si esaminano i mutageni-carcinogeni, sembra dare pochi "falsi negativi". Vi sono sostanze cancerogene come l'anilina e il difenile che non provocano rotture cromosomiche e non sono nemmeno dei potenti induttori di SCE. Altri composti che non sono mutageni o carcinogeni, provocano aumento di SCE. Lo studio degli SCE sembra anche importante per valutare danni citogenetici da agenti clastogeni somministrati come chemioterapici.

Da studi condotti su alcuni virus, si è constatato che tra questi sono presenti ceppi capaci di modificare la frequenza di SCE. Per esempio la frequenza degli scambi cromatidici in fibroblasti umani infettati con SV40 risulta più che triplicata. Anche in altre cellule umane trasformate da questo virus, gli SCE risultano aumentati sensibilmente rispetto alle cellule non trasformate (34). Linee cellulari di linfociti umani trasformate dal virus Epstein-Barr, mostrano una frequenza normale di SCE o in qualche caso un sensibile aumento. Fibroblasti embrionali di topo infettati con il virus della leucemia di Rauscher, presentano più del doppio di SCE, mentre sono

diminuiti nei linfociti del sangue periferico umano dopo vaccinazioni, o in individui che presentano infezioni virali (Herpes simplex, epatiti o influenza) (25). Il virus herpes simplex somministrato alla fine della fase "S" del-ciclo cellulare, non provoca alcun aumento di scambi cromatidici nei fibroblasti diploidi umani. Questi ultimi risultati possono essere dovuti, almeno in parte, all'insensibilità delle cellule agli SCE durante l'ultima fase "S", una risposta diversa si può avere se la somministrazione nelle cellule o nelle cavie si fa all'inizio della fase "S".

b. Azione del fumo sugli SCE

Il fumo di sigaretta, che è stato considerato uno dei fattori più importanti nella genesi di alcuni tumori, induce un aumento degli scambi cromatidici nei linfociti (23).

Lo studio delle aberrazioni cromosomiche, SCE e siti fragili condotti su linfociti di sangue periferico e cellule di midollo osseo sono usati per determinare l'effetto di mutageni o carcinogeni ambientali trovati nel fumo di sigaretta (23).

In un'indagine condotta da Chien-Song Kao-Shan e coll. (23) in pazienti di età compresa tra i 21 e i 40 anni (età media 25), il consumo giornaliero di sigarette superiore alle 20 è stato associato ad un aumento consistente di SCE; è stato osservato anche un aumento di frequenza di siti fragili e di punti di rottura cromosomici.

Questi risultati suggeriscono che il DNA cromosomico dei linfociti di sangue periferico sia sensibile al fumo di sigaretta. La valutazione degli scambi cromosomici in queste cellule può dare un indice del danno causato da questi agenti esogeni nei fumatori e la capacità individuale di riparare questi danni e forse può essere un elemento predittivo del rischio di proliferazione maligna (23).

c. Fattori genetici

Nell'uomo, le aberrazioni cromosomiche (fenomeni di non disgiunzione e gli scambi strutturali), aumentano con l'età. Altro fattore che determina la frequenza delle aberrazioni cromosomiche è il genotipo degli individui: alcune persone presentano maggior rischio di altre nell'acquisire una di queste alterazioni che possono portare conseguentemente allo sviluppo di patologie o di una neoplasia (43). Sono conosciuti infatti, geni (autosomici recessivi) che si associano ad incremento dell'incidenza di aberrazioni cromosomiche in alcune condizioni come la sindrome di Bloom, l'anemia di Fanconi e l'atassia telengectasia (tab. 5).

Malattia	**SCE**
- Anemia di Fanconi	N
- Sindrome di Bloom	↑
- Atassia telangectasia	N
- Xeroderma pigmentosum: gruppi A, B, C e D	N
- Varianti (difetti riparativi post-replicativi)	N
- deSanstis-Cacchine	N

Tabella 5. Valore degli SCE in alcune malattie genetiche. (N = n° di SCE normale).

1. La sindrome di Bloom presenta deficit di accrescimento, facies allungata con padiglioni auricolari prominenti, lesioni eritematose e teleangectasiche sul viso, elevata frequenza di SCE (circa 12 volte il valore medio). In questa patologia è stata dimostrata un'anomalia di una DNA-ligasi. I pazienti hanno un elevato rischio oncogeno, soprattutto di leucemia, linfomi, sarcomi, carcinomi del tubo digerente.

2. L'anemia di Fanconi ha come caratteristiche: bassa statura, pancitopenia, iperpigmentazione cutanea, malformazioni renali ipo-aplasia del pollice, instabilità cromosomica non associata ad aumento degli SCE. Non è noto il difetto primitivo: le ipotesi più accreditate suggeriscono un difetto nella riparazione del DNA o una incapacità a rimuovere i radicali reattivi dell'ossigeno che si formano durante il metabolismo cellulare .

3. L'atassia telangectasia presenta teleangectasia oculo-cutanee, aprassia oculomotoria, atassia cerebellare, difetto dei linfociti T e non presenta aumento della frequenza degli SCE. Un gene responsabile della malattia è stato localizzato sul braccio lungo del cromosoma 11. Il difetto primitivo riguarda la riparazione del DNA.

d. Siti fragili, rotture cromosomiche ed SCE

La definizione originale di "sito fragile" deriva da Sutherland nel 1977 (41), che con questo termine indicava un punto su un cromosoma che non presentava la stessa colorazione dell'intero cromosoma, ma appariva più chiara e normalmente coinvolgeva entrambi i cromatidi.

Il sito fragile si presentava sempre sullo stesso cromosoma e nello stesso punto, sia nel particolare paziente che in vari componenti della famiglia che presentavano la stessa patologia.

Da studi condotti, è stato osservato che queste zone possono andare più facilmente incontro a rotture (10-21), questo è stato studiato in modo più approfondito nei tumori.

Sono stati fatti studi che dimostrano la possibilità di mettere in evidenza siti fragili con sostanze di vario tipo come BrdU, MTX, FUdR, DAPI e molte altre messe in coltura a diverse concentrazioni.

Fino a qualche tempo fa i siti fragili venivano divisi in "ereditabili" e "costituzionali" dove per ereditabili si intendevano quelli più rari nella popolazione, mentre costituzionali erano quelli riscontrabili con maggior frequenza nella popolazione. Attualmente questa distinzione non è più considerata valida (17), perché tutti i siti fragili sono ereditabili, ma vi sono siti fragili che ricorrono nella popolazione più frequentemente di altri, quindi la nuova terminologia riconosce i siti fragili in: "rari", "polimorfici" e "comuni" a seconda della loro frequenza nella popolazione.

Recentemente è stata proposta la distinzione dei siti fragili in due classi: "ereditabili" più rari e "comuni" (3). Si può fare un'altra distinzione a seconda della sostanza che induce *in vitro* i siti fragili (45).

Molti autori affermano che esiste una relazione tra "siti fragili" e "rotture cromosomiche", osservabili nelle cellule tumorali. Questo è stato visto mettendo a confronto il punto sui cromosomi in cui si verificava la rottura, con la banda dei siti fragili. Sono stati riportati individui con tumori maligni, che presentavano nella stessa regione sia siti fragili che rotture cromosomiche (49).

Tra i siti fragili l'unico legato con una patologia è il sito fragile del cromosoma X che si associa con una forma di ritardo mentale (sindrome di Martin-Bell) relativamente frequente (1 su 1300 maschi).

Numerosi sono i lavori che mettono in relazione gli SCE con i siti fragili. Tra questi T.W. Glover e C.K. Stein (15) in una analisi su due siti fragili comuni (3p14 e 16q23) hanno mostrato che questi siti sono hot spots (punti caldi) non solo per lesioni cromosomiche, ma anche per gli SCE. In questi casi il numero di SCE per metafase rimane invariato, ma aumenta la frequenza di SCE in corrispondenza dei siti fragili.

Altri lavori (13-18) hanno trovato nuovi siti fragili comuni con un

aumento di frequenza, in corrispondenza dei siti, di SCE. L'aumento di frequenza di SCE è stata dimostrata anche per il sito fragile del cromosoma X (Xq27) (54).

e. Sindrome di Prader Willi e SCE

Circa metà dei casi di sindrome di Prader Willi presentano una delezione 15ql2 ed un piccolo numero presenta altri tipi di riarrangiamenti coinvolgenti il cromosoma 15ql2, l'incidenza è di 1 su 25.000.

Lo studio condotto su 10 pazienti con sindrome di Prader Willi e la delezione 15ql2, su 15 pazienti con Prader Willi ma senza la delezione e su 11 casi di controllo, ha rilevato che in tutti i casi non si aveva aumento significativo della frequenza degli SCE per cellula, veniva però osservato un aumento significativo di SCE nella regione 15q11-13 dei pazienti con Prader Willi che non portavano la delezione (46).

Questo dato suggerisce una relativa instabilità del DNA nella regione 15q11-13 nei pazienti Prader Willi senza delezione.

f. SCE e inattivazione del cromosoma X

Secondo l'ipotesi della "Lyonizzazione", uno dei due cromosomi X della femmina è quasi completamente inattivo.

A. Zhang (53), in donne che presentavano i(Xq), non ha riscontrato differenze significative della frequenza di SCE nei due cromosomi X (su quello attivo e quello inattivo) tenuto conto delle diverse dimensioni. Lo stato della condensazione cromatidica e la tarda replicazione del DNA del cromosoma X inattivo, sembra non influenzare la frequenza degli SCE.

Metodiche per evidenziare la SCD

A. Incorporazione della BrdU

(metodica proposta da Latt 1973) (26)

BrdU	10 mg
Fluorodeossiuridina (FUdR)	0,05 mg
acqua distillata	10 mg

la FUdR può essere preparata separatamente ad alte concentrazioni e aggiunta alla soluzione di BrdU (sciogliere 1 mg di FUdR in 10 ml di acqua distillata e aggiungere 0,5 ml di questa soluzione a 9,5 ml alla quale è stata aggiunta la BrdU). La soluzione di BrdU può essere usata come tale o filtrata sterilmente. Questa soluzione può essere tenuta in freezer al buio e può essere conservata in queste condizioni per 2 o 3 settimane.

- Procedimento

1. Allestire le colture di sangue periferico con le normali metodiche di routine per 24 ore.
2. Aggiungere 0,1 ml di soluzione di BrdU a ciascuna coltura contenente 10 ml di terreno e incubare al buio per altre 40-48 ore.
3. Alla fine del periodo di incubazione, aggiungere la colchicina (0,1 μg) e lasciare per l'ultima ora d'incubazione. Preparare poi i vetrini in accordo con le metodiche convenzionali adottate per la routine.

B. Metodica con Uridina

(metodica proposta da Dutrillaux e coll. e Latt nel 1973) (12-26)

- Soluzioni

1. Soluzione stock di Fluorodeossiuridina (FUdR) ($4x10^{-4}$ M)

FUdR	1 mg
acqua distillata	10 ml

conservare in freezer in vials scure.

2. Soluzione stock di Uridina ($3x10^{-3}$ M)

Uridina	1 mg
acqua distillata	1 ml

conservare in freezer in piccole aliquote.

3. Soluzione di BrdU di lavoro

BrdU	3 mg (10^{-2} M)
soluzione stock di FUdR ($4x10^{-4}$ M)	0,1 ml ($4x10^{-5}$ M)
soluzione stock di Uridina ($3x10^{-3}$ M)	0,2 ml ($6x10^{-4}$ M)
acqua distillata	0,7 ml

conservare in freezer in vials scure. La filtrazione non è necessaria. La soluzione può essere usata anche dopo alcune settimane.

- Procedimento

1. I linfociti di sangue periferico vengono incubati in termostato a 37°C per 60-65 ore.
2. Aggiungere alle colture, contenenti 10 ml di terreno, 0,1 ml di soluzione di BrdU (la concentrazione finale di BrdU, di FUdR e di Uridina nel terreno di coltura è rispettivamente 10^{-4} M, $4x10^{-7}$ M e $6x10^{-6}$ M).
3. Incubare le colture a 37°C per circa 24 ore e tenere al buio (avvolte da foglio di alluminio).
4. Aggiungere 0,02 ml di colcemid e incubare per una ulteriore ora.
5. Raccogliere le colture con i metodi usuali e preparare i vetrini.

C. Colorazione per fluorescenza con Hoechst 33258

(metodica proposta da Latt e coll. 1974) (27)

- Soluzioni

1. Soluzione stock di Hoechst 33258 (150 μg / ml)

Hoechst 33258	l,5 mg
acqua distillata	10 ml

conservare in freezer in vials scure. Questa soluzione può essere utilizzata per qualche mese.

2. Soluzione di lavoro di Hoechst 33258

soluzione stock Hoechst 33258	0,15 ml
acqua distillata	45 ml

conservare in bottiglia o in jar al buio e in frigorifero a 4°C, questa soluzione può essere conservata per circa un mese.

3. Soluzione tampone a pH 7,5 (fosfato di sodio 0,2 M)

fosfato di sodio bibasico (Na_2HPO_4)	2,8 g
acqua distillata	100 ml

questa soluzione può essere conservata a 4°C per 3-4 settimane.

- Procedimento

1. Colorare i vetrini con la soluzione colorante di Hoechst 33258 (0,5 µg / ml) al buio per 10 minuti.
2. Lavare in acqua distillata e asciugare all'aria. .
3. Montare il vetrino con coprioggetto in tampone fosfato a pH 7,5. Osservare poi con un microscopio in fluorescenza a lunghezza d'onda compresa tra 360 e 400 nm.

D. Colorazione con Giemsa

(metodica proposta da Perry e Wolff nel 1974) (37)

Soluzioni

1. Soluzione stock di Hoechst 33238 (150 µg / ml)
2. Soluzione salina di citrato di sodio 2x (2xSSC)

cloruro di sodio	17,5 g
citrato di sodio 2 idrato	8,8 g
acqua distillata	1 l

3. Tampone di Sorensen (pH 7)

fosfato di potassio monobasico (KH_2PO_4)	5,26 g
fosfato di potassio bibasico (Na_2HPO_4)	8,65 g
acqua distillata	1 1

4. Soluzione di Giemsa (2%)

tampone di Sorensen (pH 7)	49 ml
colorante Giemsa	1 ml

- Procedimento

1. Incubare BrdU (concentrazione finale 10 µm) nel terreno di coltura 24 ore prima dello scadere delle 72 ore.
2. Mettere alcune gocce di soluzione Hoechst 33258 (150 µg / ml) su ciascun vetrino, coprire con coprioggetto e lasciare per 10-15 minuti al buio e a temperatura ambiente
3. Lavare i vetrini in acqua distillata ed asciugare all'aria.
4. Montare sui vetrini un coprioggetto con soluzione 2xSSC (pH 7) ed esporre agli U.V. ad una distanza dalla sorgente di circa 20-25 cm per 1-2 ore circa (fig. 15).
5. Rimuovere il coprioggetto, lavare il vetrino in acqua distillata ed incubare in 2xSSC in bagnomaria a 60-65°C per 1-2 ore.
6. Lavare i vetrini in acqua distillata e fare asciugare, all'aria .

7. Colorare i vetrini in una soluzione fresca di Giemsa al 2% per 15-20 minuti.

E. Colorazione con DAPI

(metodica proposta da Lin e Alfi nel 1976) (31)

- Soluzioni

1. Tampone di McIlveine a pH 7

acido citrico	0,63 g
fosfato di sodio bibasico (Na_2HPO_4)	6,19 g
acqua distillata	500 ml

2. Soluzione stock DAPI

DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindole)	1 mg.
acqua distillata	5 ml

questa soluzione può essere conservata in freezer per qualche mese in vials scure.

3. Soluzione DAPI di lavoro

soluzione stock DAPI	50 µl
tampone di McIlvaine (pH 7)	15ml

questa soluzione è preparata fresca prima dell'uso.

4. Tampone fosfato di sodio a pH 11 (0,2 M)

fosfato di sodio bibasico (Na_2HPO_4)	2,8 g
acqua distillata	100 ml

- Procedimento

1. Mettere su ciascun vetrino alcune gocce di soluzione DAPI (1 µg / ml) e coprire con un coprioggetto. Tenere per circa 10 minuti al buio a temperatura ambiente.
2. Togliere il coprioggetto e lavare in acqua distillata, asciugare all'aria.
3. Coprire il vetrino con un coprioggetto mettendo tra i due il tampone fosfato di sodio a pH 11 (0,2 M) ed eliminare l'eccesso. Esaminare al microscopio in fluorescenza con una lunghezza d'onda di eccitazione compresa tra 360 e 400 nm.

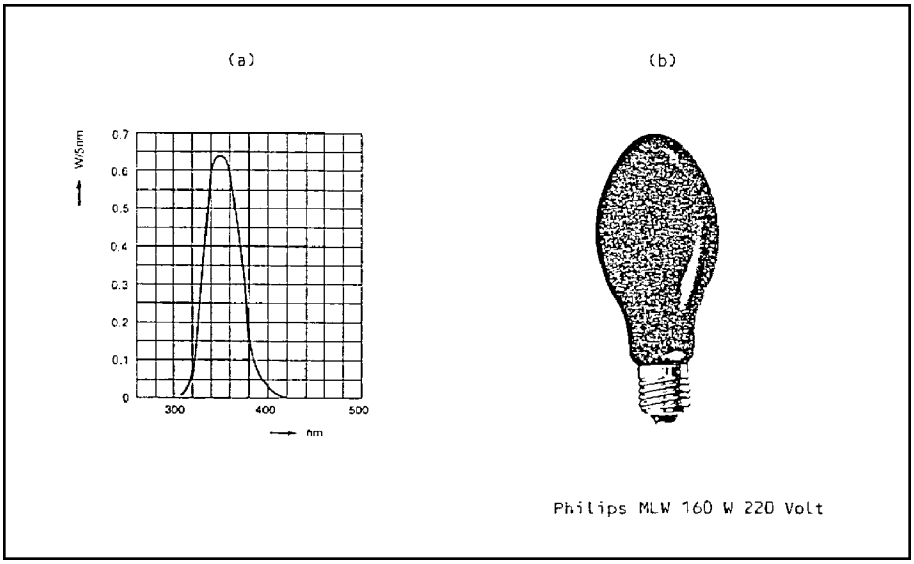


Figura 15. Caratteristiche della lampada utilizzata per radiare i preparati nella colorazione per SCD e SCE.
a) Diagramma dello spettro di assorbimento; b) tipo di lampada utilizzata.

Evidenziazione degli SCE mediante anticorpi anti-BrdU

Una prima finalità della nostra ricerca è stata la messa a punto di una nuova metodica per evidenziare gli SCE mediante l'utilizzo di anticorpi-anti-BrdU. La tecnica utilizzata deriva da quella proposta per lo studio del ciclo cellulare in colture di fibroblasti (33), dove gli anticorpi-anti-BrdU si legano ai filamenti del DNA che hanno incorporato BrdU.

Contrariamente alle tecniche di sovracolorazlone con Giemsa, gli anticorpi-anti-BrdU, danno una colorazione più intensa dei cromatidi bisostituiti, rispetto ai monosostituiti con BrdU.

Una seconda finalità è stata di definire con maggiore precisione le regioni cromosomiche che presentano gli SCE, mediante l'applicazione successiva delle tecniche di bandeggio QFQ e delle tecniche per evidenziare gli SCE.

Nello studio dei cromosomi umani i materiali che vengono utilizzati e la loro scelta, sono condizionati dal tipo di problematica che si vuole affrontare.

Il materiale più frequentemente usato per l'analisi cromosomica è il sangue periferico; con un prelievo di 0,5-1 ml si può allestire la coltura, dalla quale si ottiene un numero di mitosi sufficiente per studiare il cariotipo umano.

I linfociti presenti nel sangue periferico, sono le cellule sulle quali si può agire per indurre l'attività mitotica *in vitro*, mediante l'aggiunta al mezzo di coltura di fitoemoagglutirina (PHA), una sostanza che è capace di trasformare, in qualche ora, questi elementi cellulari in blasti capaci di una attività proliferativa.

L'incubazione del sangue nel terreno di coltura, avviene alla temperatura di 37°C per un periodo di 72 ore. Un'ora prima dello scadere di questo periodo di incubazione, si aggiunge la colchicina, una sostanza estratta dalla Colchicum Autumnale, che interferisce nella formazione del fuso mitotico e blocca la mitosi in metafase.

Dopo centrifugazione, le cellule risospese in soluzione ipotonica (soluzione di cloruro di potassio 0,56% o 0,075 M), che favorisce con un effetto osmotico la separazione dei singoli cromosomi e successivamente la rotture delle membrane cellulari. Dopo 20 minuti in bagnomaria a 37° C e successiva centrifugazione le cellule vengono quindi fissate con una soluzione di acido acetico e alcool etilico (al posto dell'alcool etilico si può mettere anche l'alcool metilico) nelle proporzioni di 1:3 per almeno 30 minuti. Dopo ulteriori lavaggi in fissativo, vengono preparati i vetrini (stesura e squash), successivamente si possono eseguire le varie colorazioni.

Per evidenziare gli SCE abbiamo seguito la metodica messa a punto da Perry e Wolff (2), che prevede l'aggiunta di BrdU (concentrazione finale 10 μm) in coltura 24 ore prima dello scadere delle 72 ore.

Il procedimento successivo fino alla stesura dei vetrini è quello usato normalmente. Numerosi sono i lavori che consigliano di procedere con la colorazione per gli SCE subito dopo aver preparato i vetrini, noi abbiamo eseguito questa colorazione anche dopo diversi giorni ottenendo ottimi risultati.

I vetrini sono messi in Hoechst 33258 (0,5 mg / ml) per 15 minuti. L'azione di questo colorante sarebbe di legarsi alla BrdU, modificando il successivo legame con altri coloranti (Giemsa, arancio di acridina).

Si monta con coprioggetto, mettendo sul vetrino qualche goccia di tampone fosfato a pH 6,8, sigillando per evitare l'evaporazione .

Si mette sotto una lampada ad ultravioletti ad una distanza di circa 10 cm per un'ora; per evitare il surriscaldamento del vetrino, bisogna raffreddare i vetrini con aria fredda.

Si rimuove il coprioggetto e si immerge in una soluzione 2xSSC (NaCl 0,3 M, citrato trisodico 0,03 M) in bagnomaria a 56°C per 20 minuti.

Risulta ora possibile, dopo un lavaggio in acqua corrente, colorare i vetrini con Giemsa (al 5% in tampone fosfato a pH 6,8) per qualche minuto. In alternativa si può effettuare una colorazione con coloranti fluorescenti come l'arancio di acridina per 20 minuti.

Per la definizione delle bande cromosomiche in cui sono avvenuti SCE si procede nel modo già descritto fino alla stesura dei vetrini, poi si esegue una metodica di bandeggio in OFQ (84).

Dopo la fotografia dei vetrini, si procede con il processo di scolorazione, che consiste nel lasciare i vetrini in alcool etilico a 95% per tutta la notte, poi si applicano le tecniche di colorazione per gli SCE viste precedentemente (15) (fig. 16).

- Immunofluorescenza con BrdU: metodica proposta

1. Preparazione dei vetrini nel modo descritto precedentemente.
2. Denaturazione in HCl 4 N per 30 minuti a temperatura ambiente e al buio.
3. Disidratazione in etanolo 70-90-100% a -20°C, 5 minuti ogni passaggio.
4. Asciugare i vetrini aIl'aria.
5. Incubare in camera umida con anticorpo primario per 2 ore a 37°C in termostato.
6. Fare 3 lavaggi di 5 minuti ciascuno in PBS 1x.

7. Incubare i vetrini con anticorpo secondario per 1 ora.
8. Fare 3 lavaggi di 5 minuti ciascuno in PBS 1x.
9. Disidratazione in etanolo 70-90-100%, ogni passaggio di 5 minuti a temperatura ambiente.
10. Asciugare i vetrini all'aria.
11. Montare i vetrini con glicerolo-DABCO ed osservare al microscopio in fluorescenza (360-400 nm).

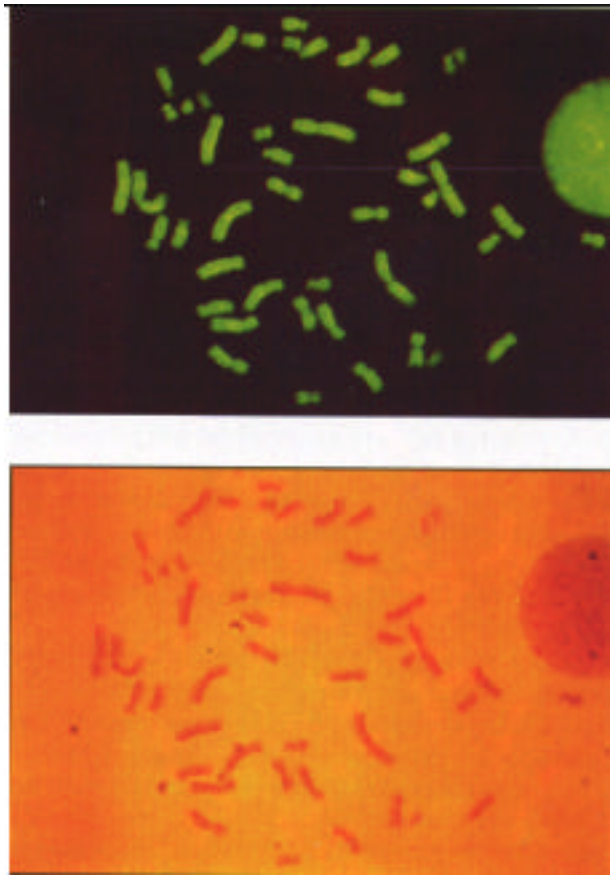


Figure 16 A e 16 B. Stessa piastra metafasica fotografata in QFQ (a) e succ - essivamente colorata per SCE con Heoechs 33258 e Giemsa (b).

Conclusioni

L'utilizzo dell'immunofluorescenza si è dimostrata una tecnica molto valida per evidenziare SCD ed SCE consentendo una buona distinzione fra i cromatidi fratelli con livelli di intensità di fluorescenza soddisfacenti (fig. 17).

La migliore differenza di colorazione tra i due cromatidi (monosostituito e bisostituito) consente di determinare con maggior precisione gli SCE, anche in quelle zone (regioni terminali o paracentromeriche) in cui si hanno scambi di piccole porzioni di cromatidio, oppure ancora, dove si verificano doppi scambi che coinvolgono piccole regioni di cromatidio; queste zone con altri coloranti a volte risultano di dubbia interpretazione (fig. 18-19).

L'osservazione dei preparati con immunofluorescenza è meno disturbata da fluorescenze parassite di fondo che degradano l'immagine ottenuta con i normali fluorocromi.

Ulteriori vantaggi dati dell'utilizzo di anticorpi-anti- BrdU rispetto l'utilizzo di coloranti fluorescenti è di poter conservare i preparati anche per diverso tempo (qualche mese a -20°C e al buio), i preparati si conservano bene e sono anche protetti dal deterioramento causato dall'olio d'immersione, cosa che molte volte non risparmia nemmeno i vetrini colorati con Giemsa.

Uno svantaggio del procedimento di immunofluorescenza e dato dal maggior numero di passaggi richiesti e quindi dal tempo necessario rispetto alla metodica tradizionale

La seconda finalità dello studio proposto, è stata di trovare una metodica che potesse individuare con maggior precisione la banda cromosomica in cui si è formato l'SCE. Dagli esperimenti condotti è emerso che sarebbe preferibile eseguire prima il bandeggio cromosomico e poi effettuare la ricerca degli SCE (fig. 16-20).

Sono state effettuate prove applicando le metodiche di bandeggio GTG o QFQ poi, dopo scolorazione dei vetrini in alcool etilico (95%), si sono ricercati gli SCE. L'utilizzo del bandeggio GTG e poi degli SCE non ha dato risultati soddisfacenti, perché rimangono sempre tracce del bandeggio GTG che può portare ad errore. Migliori risultati sono stati ottenuti applicando il bandeggio QFQ, poi la ricerca degli SCE.

La valutazione delle frequenze di SCE rimane ancora oggi un valido metodo per indagare danni reali o potenziali sul genoma: ogni miglioramento dell'evidenziabilità morfologica, come forse può attenersi attraverso l'impiego di anticorpi contro BrdU potrà risultare utile in futuro.

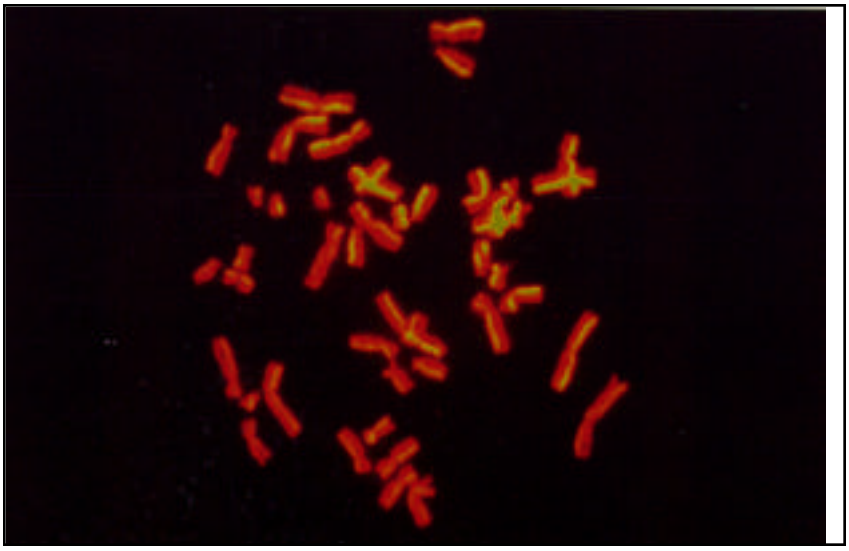


Figura 17. Piastra metafasica dopo trattamento con anticorpi-antiBrdU.

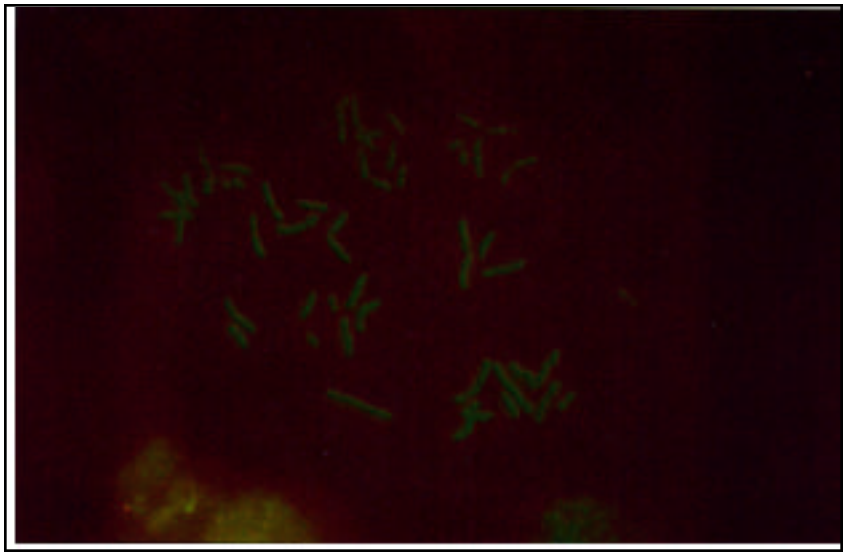


Figura 18. Piastra metafasica dopo colorazione per evidenziare gli SCE con Hoechst e arancio di acridina. Dopo due cicli con incorporazione di BrdU.

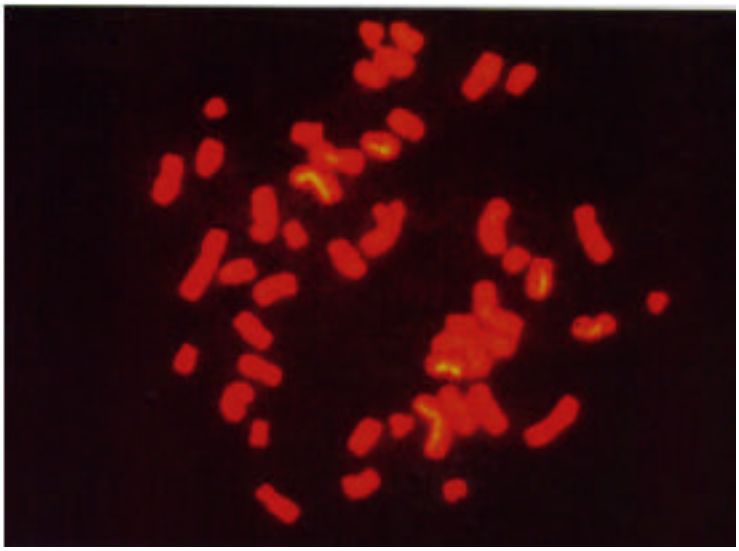


Figura 19. Piastra metafasica dopo colorazione per evidenziare gli SCE con Hoechst 33258 e arancio di acridina. Dopo 5 cicli cellulari con incorporazione di BrdU.

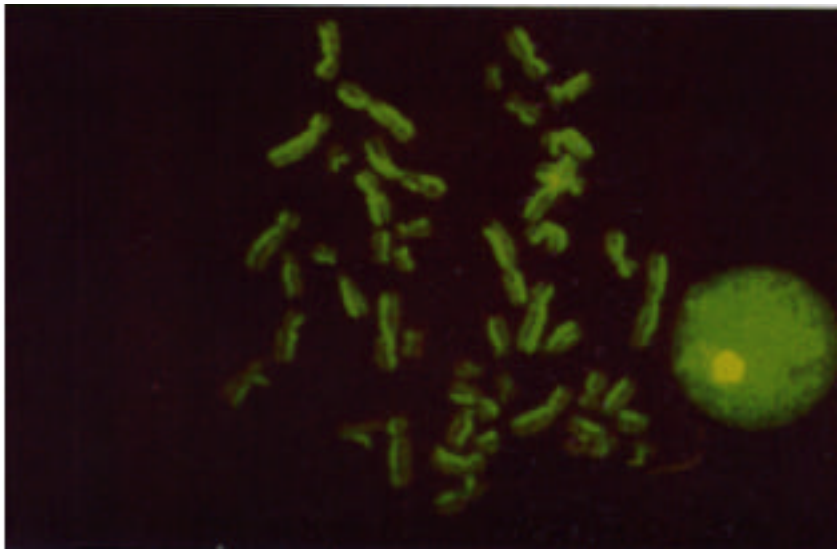


Figura 20. Piastra metafasica dopo colorazione per evidenziare gli SCD, scolorata e bandeggiata in QFQ. Si possono osservare ancora ben evidenti gli SCD. Assente il bandeggio.

Bibliografia

1) Adolph K., Cheng S.M., Paulson J.R., Laemmli J.K.: Isolation of a protein scaffold from mitotic Hela cell chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci USA 1977; 74: 4937-4941.

2) Ambros P., Schweizer D.: Euchromatin-heterochromatin; junstions are sister chromatid exchange (SCE3 “hot spots”. Kew chromosome conference II. George Allen and Unwin, London 1983; pag. 326.

3) Berger R., Bloomfield C.D., Sutherland G.R.: Report of the committee on chromosome rearrangements in neoplasia and on fragile site. Eighth International Workshop on Human Gene Mapping. Cytogenet Cell Genet 1935; 40: 490-535.

4) Bostock C.J., Christie S.: Analysis of the frequency of Sister Chromatid Exchange in different regions of chromosomes of the kangaroo rat. Chromosoma 1976; 56: 275-287.

5) Carrano A.V., Wolff S: Distribution of Sister Chromatid Exchanges in the euchromatin and heterochromatin óf the Indian muntjac. Chromosoma 1975; 53: 361-3690.

6) Carrano A.V., Minkle J.L., Stetka D.G., Moore I.I.D.H. (1980) Variation in the baseline Sister Chromatid Exchange frequenci in human lynphocytes. Envirom Mutag 1980; 2: 325-337.

7) Casperson T., Zech L., Joahnsson C., Modest E.J.: Identificatio of human chromosomes by DNA-banding fluorescent agents. Chromosoma 1970; 30: 215.

8) Chu E.H.Y., Sun N.C., Chang C.C.:Proc. Nat. Acad. Sci USA 1971; 69: 3459.

9) De Arce M.A.: The effect of donor sex and age on the number of Sister Chromatid Exchanges in human lymphocytes growing *in vitro*. Hum Genet 1981; 57: 83-85.

10) De Braekeleer M., Smith B., Lin C.C.: Fragile sites and structural rearràngements in cancer. Hum Genet 1984; 69:112-116

11) Dillehay L.E., Jacobson-Kram D., Williams J.R.: DNA Topoisomerasi and models of sister-chromatid and models of sister-chromatid exchange.Mutation Research 1989; 215: 15-23

12) Dutrillaux B., Laurent C., Counturier J., Lejeune J.: Coloration des chromosomes humains par l'acridine orange apras traitement par 5-bromodEoxyuridine. C. R. Acad Sci Ser D. 1973; 276: 3179-3181.

13) Freichtinger W., Schmid M.: Increased frequences of Sister Chromatid Exchanges at common fragile sites (1) (q42) and (19)(q13). Hum Genet 1989; 83: 145-147.

14) Gardner R.J.M., Sutherland G.R.: Chromosome abnormalities and genetic counseling. New York Oxoford 1989; pag 89-92.

15) Glover T.W., Stein C.H.: Induction of Sister Chromatid Exchanges at common fragile sites. Am. J. Hum. Genet. 1987; 41: 882-890.

16) Goodenough U.: Genetica 1985; 2a ed. Zanichelli.

17) Hecht F.: Rare, polymorphic. and common fragile sites: a classification. Hum Genet 1986; 74: 207-208.

18) Hirsch B.: Sister Chromatid Exchanges are preferentially induced at expressed and nonexpressed common fragelesites. Hum Genet 1991; 87: 302-306.

19) Hsu T.C. Pathak S.: Differential rates of Sister Chromatid Exchanges betwen euchromatin and heterochromatin. Chromosoma 1976; 58: 269-273.

20) Huang C.C.: Induction of high incidence of damage to the X chromosome of rattus (mastomys) natalensis by base analogues, viruses and carcinogens. Chromosoma 1967; 23: 162-179.

21) Jacky P.B., Sutherland G.R.: Thymidylate synthetase inhibitors and fragile-site expression in lymphocytes. Am J Hum. genet. 1983; 35: 1276-1283.

22) Kanda N.: Spontaneous sister chromatid exchange in vivo. In: Sandberg A.A. (ed) sister chromatid exchange. Liss, New York 1982; pag 279-296.

23) Kao-Shan C.S., Fine R.L., Whang-Peng J., Lee E.C., Chabner B.A.: Increased fragile sites and Sister Chromatid Exchanges in bone marrow and periferal blood of young; cigarette smokers. Cancer Res 1987; 47: 6278-6282.

24) Kato H.: Spontaneous Sister Chromatid Exchanges detested by BrdU-labeling method. Nature (London) 1974; 251: 70-72.

25) Kurvink K., Blomfield C.D., Cervenke J.: Sister Chromatid Exchange in patients with viral disease. Exp. Cell. Res. 1978; 113: 450-453.

26) Latt S.A.: Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci USA 1973; 70: 3395-3399.

27) Latt S.A.: Sister Chromatid Exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin-C. Proc Nat. Acad. Sci USA 1974; 71: 3162-3166.

28) Latt S.A., Davidson R.L., Lin M.S., Gerald P.S.: Lateral asymmetry in the fluorescence of human chromosomes stained with 33258 Hoechst. Exp. Cell. Res. 1974; 87: 425-429.

29) Latt S.A., Juergens L.A.: Determinants of Sister Chromatid Exchanges frequencies in human chromosomes. Population Cytogenetics Studies in Humans 1977; pag 217-136.

30) Latt S.A., Schreck R.R.: Sister Chromatid Exchange analysis. Am. J. Hum. Genet. 1980; 32: 297-313.

31) Lin M.S., Alfi O.S.: Detection of sister chromatid exchanges by 4'-6-diamidino-2-phenylindole fluorescence. Chromosoma 1976; 57: 219-225.

32) Marin C., Prescott D.M.: The frequency of Sister Chromatid Eexchanges following exposure to varying doses of H -Thymidine or X-rays. Journal Cell. Biol. 1964; 21: 159-167.

33) Nakayasu H., Berezney R.: Mapping replicational sites in the eucaryotic cell nucleus. J. of Cell Biology 1989; 108: 1-11.

34) Nichols W.W., Bradt C.I., Toji L.H., Godley M., Segawa M: Induction of sister chromatid exchanges by trasformation with simian virus SV40. Cancer Res. 1978; 38: 906-964.

35) Palmer C.G.: %-Bromodeoxyuridine-induced costrictions in human chromosomes. Can. J. Genet. Cytol. 1970; 12: 816-830.

36) Perry P, Evans HJ (1975) Cytological detection of mutagen carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature 258: 121-124.

37) Perry P., Wolff S.: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature 1974; 251: 156-158.

38) Razin S.V., Mantieva V.L., Giorgiev G.P.: DNA adjacent to attachment point of deoxyribonucleoprotein fibril to chromosomal axial structure is enriched in reiterated base sequences. Nuc. Acids Res. 1978; 5: 4737-4751.

39) Schubert J., Rieger R.: Sister Chromatid Exchanges and heterochromatin. Hum. Genet. 1983; 57: 119-130.

40) Strickberger M.W.: Trattato di genetica. Piccin 3a ed. 1992; pag. 538.

41) Sutherland G.R.: Fragile sites on human chromosomes: Demostration of their dependence of the type of tissue culture medium. Science 1977; 197: 265-266.

42) Taylor J.H., Woods P.S., Hughes W.L.: The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. Proc. Nat. Acad. Sci USA 1957; 43: 122-128.

43) Therman E., Kuhn E.M.: Mitotic crossing-over and segregation in man. Hum Genet 1981; 59: 93-100.

44) Tommerup N.: Induction of the fragile X on BrdU substituted chromosomes with direct visualization of Sister Chromatid Exchanges on banded chromosomes. Hum. Genet. 1989; 81: 377-381.

45) Verma R.S., Babu A.: Human chromosomes. Manual of basic techniques. Pergamon Press 1a ed. 1990; pag. 130.

46) Wenger S.L., Rauch S.D., Hanchett J.M.: Sister Chromatid Exchange analysis of the 15q11 region in Prader Willi syndrome patients. Hum Genet 1989; 83: 111-114.

47) Wolff S.: Sister Chromatid Exchange. Annu Rev. Genet. 1977; 11: 183-201.

48) Yunis J.J., Sawyer J.R., Ball D.W.: The characterization of high-resolution G-banded chromosomes of man Chromosoma 1978; 67: 293-307.

49) Yunis J.J., Brunning R.D., Howe R.B., Lobell M.: High-resolution chromosomes as an indipendent prognostic indicator in adult acute nonlymphocytic leukemia. N. Engl. J. Med. 1984; 311: 812-818.

50) Zakharov A.F., Egolina N.A.: Asynchrony of DNA rep]ication and mitotic spiralization along heterochromatic portions of Chinese hamster chromosomes. Chromosoma 1968; 23: 356-385.

51) Zakharov A.F., Egolina N.A.: Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes I. BrdU-revealed differentiates in Chnese hamster chromosomes. Chromosoma 1972; 38: 341-355.

52) Zakharov A.F., Baronouskaya L.I., Ibralmov A.I., Benjusch V.A., Demintseva V.S., Oblopeuko N.G.: Chromosoma 1974; 44: 343.

53) Zhang A., Lin M.S., Wilson M.G., Fujimoto A.: Sister Chromatid Exchanges in the human active and inactive X chromosomes. Cytogenet Cell. Genet. 1989; 52: 79-82.

54) Tommerup N.: Induction of the fragile X on BrdU-substituted chromosomes with direct visualizatio of sister chromatid exchanges on banded chromosomes. Hum. Genet. 1989; 81: 377-38

Indice

Editoriale .....pag. 3

Introduzione ..... » 5

Sister Chromatid Differentiation ..... » 6
1. Replicazione semiconservativa del DNA ..... » 6
2. Modalità di evidenziazione della Sister Chromatid Differentiation (SCD) ..... » 10

Sister Chromatid Exchanges ..... » 11
- Formazione degli SCE ..... » 12
- SCE e crossing-over mitotico ..... » 14
- Fattori che influenzano la formazione degli SCE ..... » 15
a. Mutageni e clastogeni..... » 18
b. Azione del fumo sugli SCE..... » 22
c. Fattori geneticic. Fattori genetici ..... » 22
d. Siti fragili, rotture cromosomiche ed SCE ..... » 24
e. Sindrome di Prader Willi e SCE ..... » 25
f. SCE e inattivazione del cromosoma-X ..... » 25

Metodiche per evidenziare la SCD..... » 26
A. Incorporazione della BrdU ..... » 26
B. Metodica con Uridina ..... » 26
C. Colorazione per fluorescenza con Hoechst 33258..... » 27
D. Colorazione con Giemsa..... » 28
E. Colorazione con DAPI .....» 29

Evidenziazione degli SCE mediante anticorpi anti-BrdU ..... » 31
- Immunofluorescenza con BrdU: metodica proposta ..... » 32

Conclusioni ..... » 34

Bibliografia ..... » 37

Indice ..... » 42

Caleidoscopio
Italiano

MEDICAL SYSTEMS SpA

1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:*****Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La β-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico ed fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**
28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. **Cingolani M.:** ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**
31. **Kubasik N.P.:** ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**
32. **Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.:** ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**
33. **Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.:*****Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo '88.**
34. **Guastella G., Cefalù E., Carmina M.:** ***La fecondazione in vitro.*** **Maggio '88.**
35. **Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.:** ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno '88.**
36. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (2).*** **Luglio '88.**

37. Piantino P., Pecchio F.: ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre '88.**
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio '89.**
39. Sommariva D., Branchi A.: ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. Butturini U., Butturini A.: ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. Palleschi G.: ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. Fanetti G.: ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. Contu L., Arras M..: ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E. : ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P. : ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: ***L'immunologia del diabete mellito*****. Marzo '90.**
50. Cappi F.: ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio*****. Aprile '90.**
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: ***I micobatteri.*** **Maggio '90.**
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: ***Anticorpi antinucleo*****. Giugno '90.**
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: ***Le macchine in terapia intensiva.*** **Luglio '90.**
54. Goracci E., Goracci G.: ***Gli allergo-acari.*** **Agosto '90.**
55. Rizzetto M.: ***L'epatite non A non B (tipo C)*****. Settembre '90.**
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: ***Infezione da HIV-1:patogenesi ed allestimento di modelli animali*****. Ottobre '90.**
57. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*****. Gennaio '91.**
58. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*****. Febbraio '91.**
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: ***Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti.*** **Marzo '91.**
60. Bedarida G., Lizioli A.: ***La neopterina nella pratica clinica.*** **Aprile '91.**
61. Romano L.: ***Valutazione dei kit immunochimici.*** **Maggio '91.**
62. Dondero F. e Lenzi A.: ***L'infertilità immunologica.*** **Giugno '91.**
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: ***Gli Oncogèni*****. Luglio '91.**
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: ***Infezione-malattia da HIV in Africa*****. Agosto '91.**
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: ***L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni.*** **Settembre '91.**
66. Gentilomi G.A.: ***Sonde genetiche in microbiologia.*** **Ottobre '91.**
67. Santini G.F. , Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: ***Le sonde di DNA e la virulenza batterica.*** **Gennaio '92.**
68. Zilli A., Biondi T.: ***Il piede diabetico.*** **Febbraio '92.**
69. Rizzetto M.: ***L'epatite Delta.*** **Marzo '92.**
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: ***Gli screening neonatali.*** **Aprile '92.**
71. Tavani A., La Vecchia C.: ***Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari.*** **Luglio '92.**
72. Cordido F. , Peñalva A. , De la Cruz L. F. , Casanueva F. F., Dieguez C.: ***L'ormone della crescita.*** **Agosto '92.**
73. Contu L.., Arras M.: ***Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*****. Settembre '92.**
74. Ferrara S.:***Manuale di laboratorio I*****. Ottobre '92.**
75. Gori S.: ***Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*****. Novembre '92.**
76. Ferrara S.: ***Manuale di laboratorio II*****. Gennaio '93.**
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: ***Ipertensione Arteriosa.*** **Febbraio '93.**

78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin.* Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radionuclidi del Morbo di Graves-Basedow.* Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza.* Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio 94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I lnfociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptoccocchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodellamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Settembre '94.
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori*. Novembre '94.
92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.
93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: *Immunoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.
95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: *Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale*. Luglio '95.
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*. Ottobre '95.
98. La Vecchia C., D'avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazio - ne clinica*. Dicembre '95.
99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*. Gennaio '96.
100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*. Marzo '96.
101. Cogato I. Montanari E.: *La Sclerosi Multipla*. Aprile '96.
102. Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale.* Maggio '96.
103. Fiori G.M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.
104. Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.
105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative. Ottobre '96.
106. Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: *Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*. Novembre '96.

Caleidoscopio

Rivista mensile di Medicina

anno 14, numero 106

user

KNIGHT-RIDDER INFORMATION

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0360 509973
E-mail: rassu@mbox.vol.it

Responsabile Commerciale
Alessandra Pater

EDITORE

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti
Fina Grandeppieno
Flavio Damarciasi

...il futuro ha il cuore antico MEDICAL SYSTEMS SpA

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 801005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 803498- 809070.
Internet URL: http://www.vol.it/pandora
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay, Manuali Pratici Immulite, Caleidoscopio Español, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Caleidoscopio literario, Pandora, The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

Stampa
ALGRAPHY S.n.c.
Passo Ponte Carrega, 62 R. - GENOVA
tel. 010/8366272 - Fax 010/8358069

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: ? 1996
Sped. in Abb. Post. 50%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR 627/78