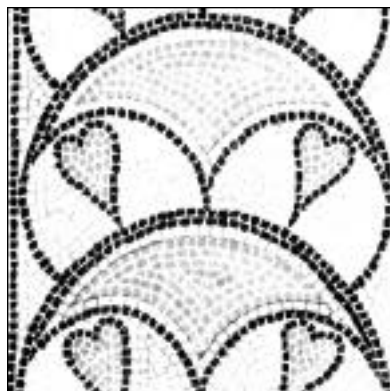


ISSN 0394 3291

Caleidoscopio

Italiano

Sped. in A. P. 45% - art.2 comma 20/b legge 662/96 - n°130 - Marzo 1999 - Direttore responsabile: Sergio Rassu - Editore: Medical Systems S.p.A. Genova - Contiene I.P. - Stampa: Tipolitografia Nuova ATA Genova



Giuseppe Castello
Immacolata Silvestri

Il linfocita quale dosimetro biologico

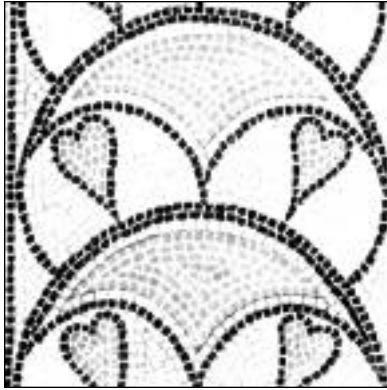
Direttore Responsabile
Sergio Rassu

130

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1999

Caleidoscopio

Italiano



Giuseppe Castello
Immacolata Silvestri

*Servizio di Immunologia,
Dipartimento di Terapia Medica,
Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori
Fondazione "G. Pascale",
Napoli.*

Il linfocita quale dosimetro biologico



130

Direttore Responsabile
Sergio Rassa



Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1999

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.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti 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. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

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 Rassa
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari**

Caleidoscopio

Italiano

Editoriale

La politica sanitaria oggi non investe abbastanza in prevenzione e molto per cercare di trattare, con i limiti che è possibile attendersi, numerose patologie che sicuramente potrebbero avere un rilievo sanitario, sociale, economico ed umano molto meno rilevante se esistesse una cultura della prevenzione. Per questo motivo e per supportare questa cultura, ospitiamo questa interessante monografia che apre orizzonti estremamente stimolanti sull'argomento.

Infatti, nel campo della oncologia, la prevenzione passa attraverso la eliminazione dell'esposizione ai carcinogeni ambientali e occupazionali. Questi infatti agiscono determinando una serie di alterazioni genetiche critiche che, quale risultato finale, determinano l'insorgenza del cancro.

Questa opera di prevenzione può essere realizzata con l'individuazione delle conseguenze genotossiche dell'esposizione a dei sospetti carcinogeni con l'uso di test rapidi e di semplice esecuzione su cellule facilmente reperibili.

L'uso dei linfociti costituisce sotto questo punto di vista un modello ideale e l'individuazione di indicatori di citogenotossicità con lo studio delle aberrazioni cromosomiche, la frequenza di scambi tra cromatidi fratelli e la frequenza dei micronuclei costituisce uno strumento fondamentale in questa strategia tesa alla individuazione e la valutazione di gruppi a rischio.

Questa monografia va comunque oltre questi metodi basilari, illustrando anche il test dei micronuclei con blocco della citodieresi (CBMN), con la possibilità di valutare l'indice di divisione nucleare (NDI), di osservare ponti nucleoplasmatici, delle varianti linfocitarie HPRT, la valutazione delle cellule apoptotiche sino ad illustrare il test CREST associato al saggio CBMN e l'esame FISH.

Si tratta quindi di un lavoro completo che potrà fornire quei riferimenti elementari a chi inizia a lavorare in questo campo della medicina.

Abbiamo dovuto sintetizzare in poche righe l'intensa attività scientifica degli autori che hanno contribuito in modo originale allo sviluppo di questo tema non sufficientemente noto.

Il dottor Giuseppe Castello, Specialista in Allergologia ed Immunologia Clinica, nonché in Oncologia, è stato post-doctoral fellow per presso il Dipartimento di Microbiologia ed Immunologia del New York Medical College, Valhalla. Attualmente è Primario del Servizio di Immunologia e dall'agosto 1997 Direttore del Dipartimento di Terapia Medica dell'Istituto Nazionale dei Tumori di Napoli - "Fondazione G. Pascale". Dopo essere stato Vice Direttore Scientifico dello stesso Istituto, dall'agosto del 1998 è Direttore Scientifico. E' inoltre Responsabile scientifico dell'istituendo Centro di Ricerche in Oncologia Pediatrica, Mercogliano (AV), sede periferica dell'Istituto Tumori di Napoli. Inoltre, fa parte della Commissione Regionale per lo Studio e la Sorveglianza sull'AIDS, della Commissione Oncologica Nazionale e di quella della Regione Campania è coresponsabile del Centro di Riferimento Diagnostico Regionale per l'AIDS ed è Responsabile di vari Progetti di Ricerca. Quale dimostrazione della intensa attività scientifica dell'autore concludiamo dicendo che è autore di 10 volumi editi a stampa e di 217 comunicazioni a congressi e 134 pubblicazioni.

La dottoressa Immacolata Silvestri dopo la laurea in Scienze Biologiche ha conseguito il Diploma di "Biotecnologie", ha frequentato il Servizio di Genetica Medica dell'ospedale "A. Cardarelli" di Napoli diretto dal Prof. V. Venturo. Vincitrice di una prima borsa di studio, ha lavorato presso il laboratorio di Citogenetica della Sezione di Ematologia, Dipartimento di Biopatologia Umana Università "La Sapienza" diretto dal Prof. F. Mandelli e dalla Prof. G. Alimena e presso il Servizio di Genetica Medica dell'ospedale "A. Cardarelli" di Napoli e quindi di una seconda borsa di studio del Ministero della Sanità lavorando presso la divisione di Ematologia oncologica dell'Istituto Tumori di Napoli, Fondazione "G. Pascale". Nel Gennaio 1993 ha avuto il riconoscimento di merito nell'ambito della ricerca ematologica. Attualmente le è stato conferito dal Ministero della Sanità un contratto di collaborazione nell'ambito del progetto di ricerca "Studio dell'attivazione dei monociti per la individuazione di indicatori utili per le bioterapie", che sta svolgendo presso l'Istituto dei Tumori di Napoli, Fondazione G. Pascale.

Sergio Rassa

Introduzione

L'uomo è quotidianamente, e in genere inconsapevolmente, esposto ad una serie di sostanze nocive, molte delle quali dotate di potere mutageno/cancerogeno. Il numero di tali sostanze, presenti nell'ambiente di vita e/o di lavoro, o introdotti dall'esterno attraverso gli alimenti, i farmaci, e via dicendo, è in continuo incremento.

L'esistenza della molteplicità di situazioni a rischio impone la disponibilità da una parte di mezzi d'intervento tesi possibilmente all'eliminazione, ove possibile, delle sorgenti di rischio, alla prevenzione dell'esposizione, alla riduzione degli effetti nocivi per ricondurli a livelli di tollerabilità per l'organismo umano; dall'altra di un sistema globale di monitoraggio per individuare e valutare l'esposizione. Molto si sta lavorando al riguardo grazie anche ad una maggiore attenzione rivolta dal Legislatore alla problematica, allo scopo di coniugare, secondo il nuovo bisogno di salute, una migliore qualità di vita con tecnologie più pulite, e restituire compatibilità ambientale e sicurezza dei prodotti. Il decreto legislativo n. 626/94, emanato in attuazione delle direttive U.E. 89/391, 89/654, 89/655, 89/656, 90/269, 90/270, 90/394 e 90/679, e le successive modifiche ed integrazioni fissano le regole di base per la prevenzione e la sicurezza dei lavoratori in tutti i settori di attività, pubblici e privati. Restano però del tutto indefiniti i criteri, le modalità, i mezzi per valutare l'avvenuta esposizione, i rischi corsi o i danni riportati, nonché le strategie da porre in essere per pervenire ad un corretto monitoraggio biologico dell'individuo. Del resto, le metodiche al momento disponibili non consentono ancora di dare una risposta esaustiva all'esigenza del Legislatore. Il presente lavoro vuole dare un contributo in tal senso, portando la discussione sugli esami al momento accreditabili o in possesso dei requisiti essenziali per valutare l'esposizione dell'individuo a sostanze potenzialmente genotossiche.

Al presente, infatti, uno degli obiettivi prioritari per gli "addetti ai lavori" è la messa a punto e validazione di metodiche e procedure in grado di evidenziare e differenziare eventuali danni precoci riportati dal DNA (*end-points* citogenetici) di cellule bersaglio (linfociti, cellule staminali, cellule esfoliate) esposte all'azione di agenti potenzialmente genotossici. Il fine ultimo è la proposizione di protocolli di dosimetria biologica individuale ed interventi di sorveglianza globale (25).

Indicatori citogenetici di genotossicità

Tra gli indicatori citogenetici di genotossicità più studiati e proposti per la valutazione di gruppi a rischio vanno considerati:

1. la frequenza di aberrazioni cromosomiche (AC);
2. la frequenza di scambi tra cromatidi fratelli (*Sister Chromatid Exchanges*, SCE) (vedi *Caleidoscopio* n° 106);
3. la frequenza di micronuclei (MN).

Le aberrazioni cromosomiche

L'analisi delle aberrazioni cromosomiche in linfociti periferici di soggetti esposti ad agenti tossici è stata, per il passato recente, il metodo più usato. Le aberrazioni risultano dalla rottura e riarrangiamento di interi cromosomi in forme abnormi in seguito all'azione di una serie di sostanze capaci di alterare direttamente la struttura del DNA, come le radiazioni ionizzanti o agenti radiomimetici, o di distorcere significativamente l'elica del DNA, come gli agenti intercalanti. Le aberrazioni strutturali possono essere classificate in instabili o stabili a seconda della loro capacità di persistere nella progenie cellulare.

Le aberrazioni instabili consistono di frammenti dicentrici, ad anello, acentrici o altri riarrangiamenti asimmetrici, e possono portare a morte cellulare se il DNA e, di conseguenza, i cromosomi si frammentano fino ad andare incontro ad apoptosi. Le cellule che sopravvivono, pur con aberrazioni cromosomiche, danno vita ad una progenie con delezione di materiale genetico; questa di norma non viene tollerata in cellule che vanno incontro a divisione, a meno che non si tratti di cellule trasformate.

Le aberrazioni stabili, trasmissibili alla progenie cellulare, consistono in traslocazioni bilanciate, inversioni, e altri riarrangiamenti simmetrici, ed hanno più o meno la stessa frequenza di formarsi degli altri riarrangiamenti asimmetrici (Fig. 1).

Cromosomi originari	Rotture	Cromosomi finali	Aberrazione
			traslocazione semplice
			traslocazione reciproca eucentrica
			traslocazione reciproca aneucentrica
			shift
			trasposizione
			delezione terminale perso
			delezione interstiziale perso
			chromosoma ad anello perso
			inversione pericentrica
			inversione paracentrica
			isocromosoma spesso perso

Figura 1. Principali tipi di aberrazioni cromosomiche.

L'interscambio di DNA tra cromatidi fratelli

L'interscambio di DNA tra cromatidi fratelli (SCE) origina da rotture del DNA e riunione in siti apparentemente omologhi su due cromatidi di un singolo cromosoma. E' un fenomeno che si verifica normalmente nelle cellule, ma la frequenza di SCE varia in rapporto a fattori esogeni ed endogeni, e può essere incrementata dalla esposizione a svariati agenti (per cui risente maggiormente, rispetto alla prima, anche di alcuni fattori di confondimento, quali l'abitudine al fumo di sigarette). Pertanto, il test SCE presenta una variabilità legata a problemi metodologici, pur essendo meno laborioso e più sensibile del precedente, almeno per valutare l'esposizione a sostanze chimiche S-dipendenti (il cui effetto, cioè, si manifesta nella fase S del ciclo cellulare). La persistenza del danno che porta alla formazione di SCE è di minor durata, per cui il metodo può essere utile per studiare l'effetto di esposizioni recenti.

I micronuclei

I micronuclei (MN) si formano al termine di una divisione cellulare dalla condensazione di frammenti acentrici di cromosomi o di cromosomi interi che rimangono indietro durante i movimenti dell'anafase per cui vengono esclusi dal nucleo principale; originano così, nelle cellule in interfase, corpuscoli intracitoplasmatici liberi, di forma rotondeggiante o ovalare, chiaramente distinti dal nucleo principale, rispetto al quale hanno dimensioni nettamente inferiori (da 1/3 a 1/16 del nucleo principale). I MN vengono pertanto ritenuti indicatori indiretti di aberrazioni cromosomiche strutturali. La loro rivelazione è semplice e l'esecuzione del test non richiede particolari abilità tecniche, come nel caso delle AC e degli SCE, che inoltre presuppongono la capacità di identificare i singoli cromosomi dalle bande (ottenute con coloranti quali il Giemsa, l'arancio di acridina, la chinacrina) la cui disposizione (*o pattern*) è caratteristica di ogni cromosoma (Fig. 2).

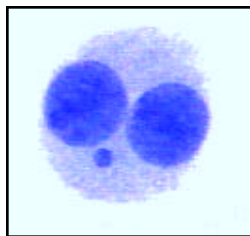


Figura 2. Linfocita binucleato con micronucleo.

Va inoltre sottolineato che il test dei MN utilizza cellule in interfase, cellule cioè più facilmente reperibili nell'ambito di una popolazione cellulare, e non cellule in metafase (stadio della mitosi in cui i cromosomi si osservano più facilmente), come nel caso dello SCE e delle AC. Infine, il test dei micronuclei si presta all'automazione, per cui si candida a test di prescreening con la considerazione che la aspecificità che lo contraddistingue (non si sa cosa viene eliminato nel micronucleo) può essere superata, al bisogno, associando ad esso altre tecniche (tab. 1).

Aberrazioni cromosomiche	Scambio di cromatidi fratelli	Test dei micronuclei
bassa sensibilità (data la bassa frequenza di aberrazioni)	sensibilità intermedia	sensibilità intermedia
di non facile esecuzione per cui richiede personale particolarmente esperto	difficoltà intermedia di esecuzione	bassa difficoltà di esecuzione
tempi lunghi di esecuzione	alta variabilità metodologica	alta variabilità metodologica
alto costo	parecchi fattori di confondimento	alcuni fattori di confondimento
non utilizzabile per tests di screening breve	utile per test dopo una recente esposizione	richiede la conta di un elevato numero di cellule si presta all'automazione

Tabella 1. Confronto tra i diversi metodi citogenetici impiegati per misurare indatti dall'esposizione ad agenti genotossici.

Il test dei micronuclei è notevolmente evoluto nel corso dell'ultimo ventennio migliorando le sue potenzialità. Le tappe di questa evoluzione sono segnate: a) dall'introduzione della citocalasina B, che consente una chiara identificazione dei MN in cellule binucleate; b) dalla possibilità di identificare il contenuto dei MN associando al test dei MN altre metodiche, come il CREST e la FISH (vedere in seguito).

Definizione di micronucleo

Una delle prime definizioni di micronucleo si deve a Rieger *et al.* (1968 in "Glossary of Genetics and Cytogenetics") che definirono il micronucleo come "un nucleo aggiuntivo e separato dal nucleo principale di una cellula, prodotto durante la telofase di mitosi o meiosi, e costituito da cromosomi interi persi o da frammenti di cromosomi derivati da cambiamenti cromosomiali spontanei o indotti sperimentalmente". Già negli anni '30-'40, alcuni citogenetisti avevano descritto la presenza di MN in cellule derivanti da diversi tessuti dopo esposizione a radiazioni ionizzanti attribuendo la loro formazione alla presenza di frammenti e ponti di cromatina. Anche i cosiddetti corpi di Howell-Jolly nei reticolociti umani altro non sono che cromosomi che si sono distaccati precocemente dal fuso mitotico; essi originano dalla frammentazione nucleare o incompleta espulsione dall'eritrocita durante la sua genesi dal normoblasto; sono poco frequenti negli individui sani, ma diventano più numerosi negli individui splenectomizzati e nei pazienti affetti da anemia emolitica (dal momento che vengono di norma eliminati nella milza). Schmid (70) ha poi dimostrato che questi "micronuclei" divenivano più frequenti in animali esposti a mutageni.

Una peculiarità degli eritrociti è costituita dal fatto che gli eritroblasti espellono il nucleo dopo la loro ultima mitosi ma per ragioni sconosciute non espellono i loro MN sicché ne è possibile l'osservazione. I giovani eritrociti sono policromatici, si colorano in bluastro, non in rosso; i MN presenti nel citoplasma di queste cellule sono chiaramente evidenziabili e se ne può facilmente stimare la frequenza. Il test degli eritrociti policromatici è stato diffusamente utilizzato per valutare l'effetto genotossico di diverse sostanze ed è spesso semplicemente indicato come "test dei micronuclei *in vivo*".

Un passo molto importante che ha ampliato notevolmente il campo di applicazione del test MN è stato rappresentato dalla possibilità di valutare la presenza di MN in linfociti di sangue periferico tenuti in coltura ed esposti *in vitro* a mutageni (14). Il test dei MN presentava infatti una serie di limiti: a) una cellula che ha subito un danno a carico del DNA può esprimere questa condizione sotto forma di micronucleo solo se ha completato un ciclo mitotico dopo l'insulto genotossico; b) il livello di MN osservato in una popolazione in divisione dipende dalla proporzione di cellule che si dividono; c) la frequenza di MN diminuisce se la cellula va incontro a più divisioni mitotiche dopo l'insulto genotossico (28). Di conseguenza, il confronto della frequenza dei MN tra due popolazioni di cellule in divisione è impossibile, a meno che le cinetiche di divisione nucleare dopo il contatto con l'agente mutageno non siano identiche; ciò significa che un valore assoluto della frequenza dei MN può essere ottenuto solo se il conteggio viene fatto in cellule che sono andate incontro ad una sola divisione.

Il test CBMN o test dei micronuclei con il blocco della citodieresi

Il grande progresso concettuale e metodologico del test dei MN si è realizzato allorché Fenech e Morley realizzarono, nel 1985, che l'uso della citocalasina B (Cito B) offriva un sistema semplice ed efficace per identificare le cellule che erano andate incontro ad un ciclo mitotico, da quelle cellule che non si erano divise affatto o si erano divise due volte (27). Le cellule esposte alla Cito B, una sostanza che inibisce la citodieresi senza inibire la mitosi (9), appaiono infatti binucleate, se hanno avuto una mitosi.

Il metodo, definito "cytokinesis-block micronucleus assay" (test CBMN), presenta una maggiore sensibilità, e quindi offre una maggiore precisione, rispetto al test convenzionale, senza il blocco della citodieresi (26). Da allora il test ha ricevuto un grosso impulso: l'esame veniva ottimizzato; si rendevano disponibili nuovi parametri per studi di genotossicità e di cinetica cellulare; l'indagine acquistava in semplicità, rapidità, riproducibilità.

I motivi del successo per il test CBMN (tab. 2) vanno pertanto ricercati nelle considerazioni che seguono:

1. si tratta di un esame semplice, rapido e riproducibile;
2. richiede tempi brevi di osservazione (è sufficiente un solo ciclo di divisione nucleare);
3. consente di identificare e quindi contare (vedi indice di divisione nucleare) le cellule che non si sono divise in coltura, le cellule che si sono divise una sola volta, e quelle che si sono divise più di una volta;
4. consente la stima parallela (sullo stesso campione di cellule in coltura) di:
 - ritardo mitotico (frequenza di cellule binucleate);
 - rottura/perdita di cromosomi (frequenza di MN con o senza marcatura del centromero/cinetocore);
 - non disgiunzione di cromosomi (distribuzione di doppia marcatura in macronuclei di cellule binucleate);
 - apoptosi (frequenza di nuclei condensati);
5. grazie ad un'affidabile risoluzione biodosimetrica permette la costruzione di curve dose-risposta e quindi la stima della dose assorbita dal bersaglio, della sensibilità intrinseca dell'individuo, dei tempi necessari per la riparazione del danno indotto a carico del DNA;
6. si presta all'automazione.

L'osservazione e quantizzazione dei MN può essere effettuata, oltre che sui linfociti o cellule in coltura, in vari tipi di cellule come, ad esempio, le cel-

1. Prelevare dal paziente sangue periferico con siringa eparinata, considerando che per ciascun punto sperimentale ne occorrono 0.5 ml
2. Sospendere 0.5 ml di sangue (per ciascun test) in terreno di coltura (RPMI 1640 3.8 ml + PHA (2%) 0.1 ml + FCS (20%) 1 ml + Antibiotici (penicillina 5.000 IU/ml., streptomina 5.000 µg/ml) 0.1 ml (2%). Il volume finale in ciascuna fiasca di coltura sarà uguale a 5 ml
3. Porre le fiasche in un incubatore a 37 °C e 5% di CO₂
4. Alla 44^a ora di coltura aggiungere alle colture la Citocalasina B in concentrazione pari a 6 µg/ml
5. Alla 72^a ora centrifugare le cellule a 1040 rpm per 10', eliminare il sovrnatante, risospendere il "pellet" in 4 ml di PBS
6. Centrifugare di nuovo, aspirare il sovrnatante ed aggiungere 5 ml di soluzione ipotonica (KCl 0.56%) lentamente per lisare gli eritrociti senza danneggiare le membrane dei linfociti
7. Risospendere gentilmente le cellule, lasciarle sedimentare per 2' a temperatura ambiente
8. Ricentrifugare le cellule a 1040 rpm per 10', aspirare il sovrnatante, e fissare le cellule in una soluzione di alcool etilico (C₂H₅OH) e acido acetico (CH₃COOH) nelle proporzioni 5:1
9. Centrifugare e risospendere il pellet di nuovo nella soluzione di fissativo prima indicata
10. Fare ulteriori lavaggi in fissativo fino a chiarificare il preparato
11. Lasciare le cellule in fissativo una notte a 4 °C
12. Su vetrini ben lavati far cadere alcune gocce della soluzione concentrata di fissativo e cellule (stesura e "squash")
13. Far asciugare i vetrini e colorarli con Giemsa al 5% in H₂O distillata per 10', o sottoporli al CREST
14. Per ciascun punto sperimentale contare almeno 1000 cellule binucleate

NB: Il punto fondamentale per una corretta conservazione del citoplasma dei linfociti rimane un appropriato controllo del tempo di trattamento ipotonico e il numero di rpm della centrifuga.

Tabella 2. Il test CBMN con linfociti in coltura da sangue intero.

lule esfoliate della mucosa orale, esofagea, della vescica urinaria e della cervice uterina. Un incremento della frequenza di MN in tali cellule indica un aumentato rischio di cancro, e potrebbe essere un utile indicatore per monitorare o predire l'efficacia di strategie terapeutiche.

Il linfocita quale dosimetro biologico

Tra le cellule bersaglio su cui valutare gli effetti dell'esposizione ad agenti genotossici, il linfocita, cellula chiave per le risposte immunitarie, si sta imponendo quale dosimetro biologico ideale in quanto:

- si tratta di una cellula che circola in tutto l'organismo, cioè lascia il sangue, attraversa organi e tessuti linfatici, e rientra nel sangue; in media ogni passaggio attraverso il sangue dura tre minuti, sicché il linfocita può percepire e registrare l'insulto genotossico ricevuto dai vari distretti dell'organismo;
- è una cellula facilmente reperibile, può essere tenuta in coltura, per cui si presta bene ad esposizioni *in vitro* ad agenti mutageni per curve dose: risposta (12);
- esistono linfociti a breve e lunga vita, fino a diverse decadi;
- il linfocita "memorizza" il contatto, e può esprimere le "conoscenze" acquisite dopo attivazione *in vitro*. Se pertanto il danno cromosomico persiste non riparato nelle cellule in fase di quiescenza del ciclo cellulare (G_0), cumularsi, lo stesso può essere rilevato quando la cellula va incontro a divisione mitotica *in vitro*. Sicché, una frequenza aumentata di MN (o di aberrazioni cromosomiche) può essere il risultato di esposizioni recenti, o, in taluni casi, di esposizioni pregresse, e quindi di effetti cumulativi.

La frequenza di MN nei linfociti umani è in media 7.8 ± 5.2 ("range" compreso tra 3 e 25) per 1000 cellule ed è fortemente influenzata da sesso ed età del soggetto, con un incremento medio di 0.17 MN/anno (81).

Danno genetico e ciclo cellulare

L'azione espletata dai diversi agenti genotossici sul DNA cellulare, che rappresenta la molecola bersaglio, varia a seconda della loro natura nonché dello stadio in cui si trova la cellula bersaglio (15). Quando sono in circolo, la maggior parte dei linfociti sono in fase "resting", ovvero in stadio G_0 del ciclo cellulare. Se stimolate da un mitogeno, le cellule rientrano in ciclo (G_1 , S, G_2 , e mitosi). Nella fase G_1 i cromosomi si comportano come una singola doppia elica di DNA, che si replica successivamente, nella fase S. Nella fase G_2 i cromosomi sono analoghi a due doppie eliche di DNA, cioè due cromatidi fratelli per cromosoma.

Le radiazioni ionizzanti inducono aberrazioni tipo cromosoma in G_0 e G_1 , aberrazioni tipo sia cromosoma che cromatide in S, aberrazioni tipo cromatide in G_2 . La frequenza di aberrazioni tipo cromosoma rimane costante, a meno che la cellula non muoia o non venga rimpiazzata da una cellula non danneggiata proveniente dal pool delle cellule staminali; ne deriva che questo tipo di aberrazioni è riscontrabile anche molti anni dopo l'esposizione.

I mutageni chimici inducono per lo più aberrazioni tipo cromatide: le cellule devono passare attraverso una fase S per dar luogo ad aberrazioni, per cui le stesse devono essere preventivamente stimulate da un mitogeno *in vitro*. Questi agenti, cosiddetti S-dipendenti, sono molto efficaci nell'indurre scambi tra cromatidi fratelli (SCEs). Pertanto, dal tipo e dalla persistenza delle lesioni indotte sul DNA si può determinare il danno citogenetico subito dalla cellula stimolata. Il dato è molto importante in quanto i linfociti di persone esposte possono rimanere quiescenti in circolo per settimane, mesi, anni, dopo di che possono essere stimolati *in vitro* ed evidenziare il danno ricevuto anche a lunga distanza dall'insulto; d'altra parte, il lungo lasso di tempo trascorso può essere sufficiente per la cellula per porre riparo alla lesione. Il riscontro di aberrazioni cromosomiche in un soggetto esposto è pertanto il risultato di una serie di eventi: a. la conferma della induzione prolungata del danno; b. l'assenza o l'insufficienza dei meccanismi di riparazione del DNA; c. l'inefficacia dei meccanismi di rimozione e redistribuzione dei linfociti dal pool circolante.

Problemi inerenti l'uso della Citocalasina B

L'introduzione della citocalasina B ha favorito la diffusione della metodica, ma presenta anche alcuni svantaggi. La sostanza inibisce la citodieresi legandosi a complessi ad alto peso molecolare della membrana plasmatica capaci di indurre la polimerizzazione dell'actina e quindi l'assemblaggio dei microfilamenti indispensabile per la formazione della rima di clivaggio (51). L'efficienza con cui la Cito-B esercita tale attività dipende dalla concentrazione usata. È questo un elemento critico nel saggio dei MN, in quanto la loro frequenza nelle cellule binucleate dipende dall'efficienza con cui viene bloccata la citodieresi delle cellule in coltura (80). Pertanto, quando si lavora con linee cellulari, occorre pre-determinare la concentrazione ottimale di Cito-B da usare, nonché i tempi ottimali di esposizione al citobloccante per ottenere il massimo numero di cellule binucleate.

La possibilità che la Cito-B possa provocare di per sé la formazione di MN è stata a lungo indagata ed è stato dimostrato che non esiste un effetto dose-risposta per l'induzione di MN nelle cellule binucleate se si usano

concentrazioni comprese tra 1 e 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nei tipi cellulari normalmente utilizzati (linfociti umani, linfociti murini di milza, fibroblasti) (29, 94, 66, 52). Se si impiegano cellule tumorali (EL4 e BW5147, linee T cellulari di linfoma) o linee stabilizzate una dose errata di Cito-B può indurre fenomeni di frammentazione del DNA. Un esempio di quanto appena accennato è fornito da una serie di studi condotti nel nostro laboratorio per determinare la dose ottimale di Cito-B per la formazione di cellule binucleate usando linfociti e linee cellulari umane stabilizzate (U937, cellule monocito-macrofagiche; KG-1, cellule di leucemia mieloide acuta; Molt-4, cellule di leucemia linfoblastica; HL-60, cellule di leucemia promielocitica; LLC, cellule di leucemia linfatica cronica CD5^+ , ottenuta nel nostro laboratorio; Colo-38, cellule di melanoma; Daudi, cellule di linfoma di Burkitt). Le cellule Molt-4 e Daudi sono molto sensibili alla Cito-B, anche a dosi estremamente basse, per cui il nucleo si frammenta facilmente; le cellule Molt-4 esposte alla Cito-B mostrano MN legati al nucleo principale con ponti nucleoplasmatici, per cui non sono utilizzabili in test CBMN. Le cellule U937 (Fig. 3 e 4), KG-1, HL60 presentano la massima resa di cellule binucleate con una esposizione, dopo il contatto con l'agente genotossico, ad una concentrazione di 3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di Cito-B per 48 ore (intervallo di tempo e concentrazione sono cruciali: per le HL60, alla 24^a ora solo pochissime cellule appaiono binucleate, mentre in 72^a ora il 100% delle cellule si mostra plurinucleato).

Un diverso approccio è stato richiesto dalle cellule LLC e Colo-38, che crescono aderenti alla fiasca di coltura; onde evitare un distacco massivo di cellule indotto dalla Cito-B per interferenza con le glicoproteine di membrana si è utilizzata una concentrazione sub-ottimale di Cito-B pari a 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Questa concentrazione è sufficiente a determinare la produzione di cellule binucleate nel 36% delle LLC e nel 51% delle Colo-38 (Fig. 5 e 6).

Nelle Figure 3-6 che seguono viene appunto mostrato come varia il numero dei micronuclei in base alle dosi di radiazioni impiegate (dose unica vs dose frazionata), al tempo di osservazione. Nella figura 7 viene illustrata come varia la percentuale di binucleate rispetto al tempo di osservazione.

La Cito-B può infine mascherare l'individuazione di sostanze chimiche che sono anch'esse inibitrici della citodieresi o della polimerizzazione dei microfilamenti.

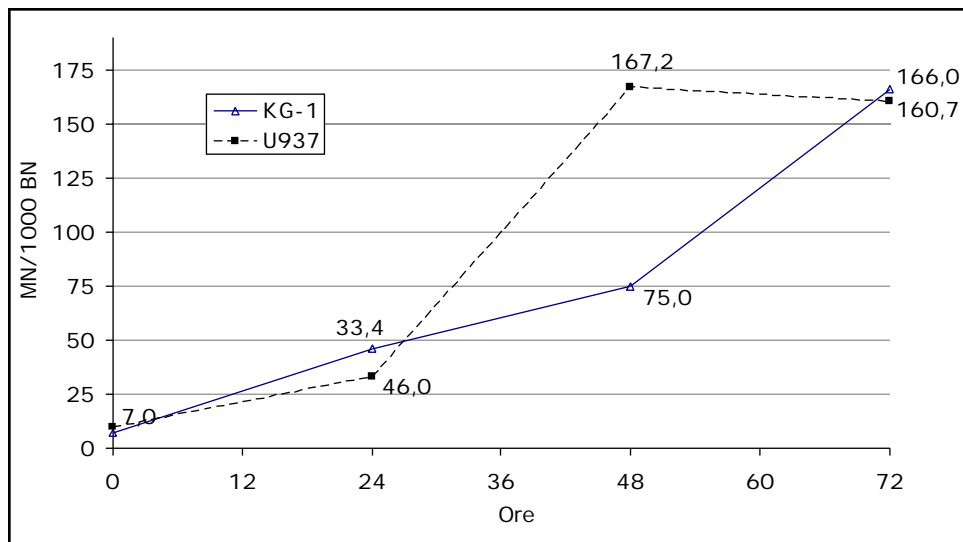


Figura 3. Cellule in coltura irradiate con una dose di 4.0 Gy.

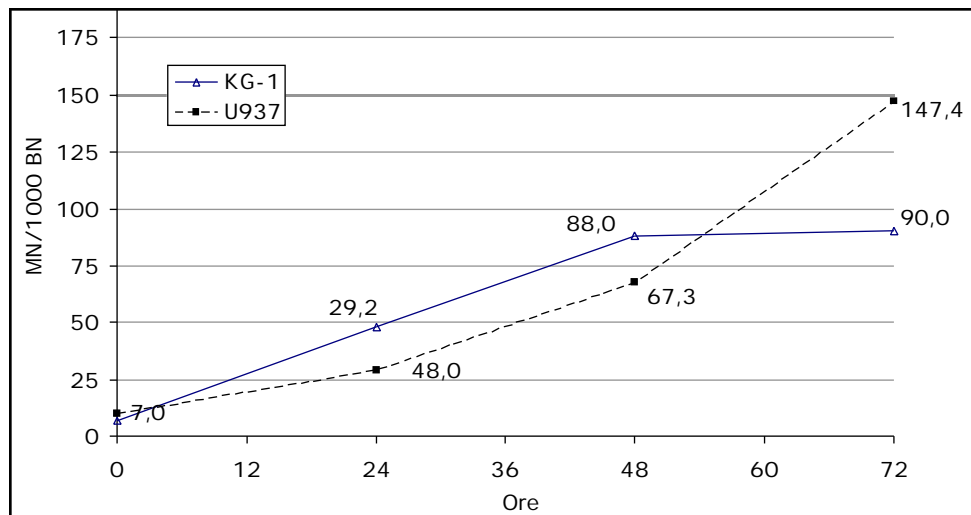


Figura 4. Cellule in coltura irradiate con una dose frazionata (3 x 1.7 Gy).

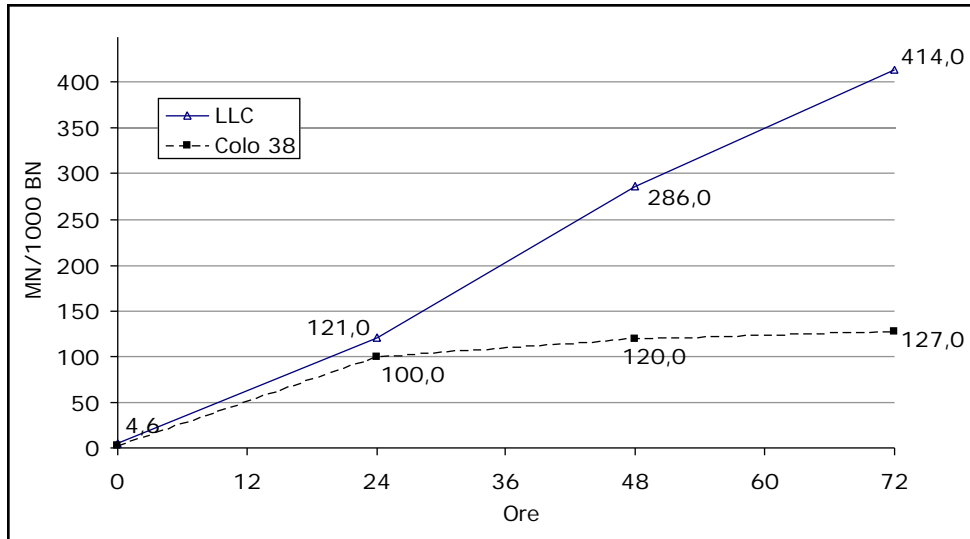


Figura 5. Cellule in coltura irradiate con una dose di 10.12 Gy.

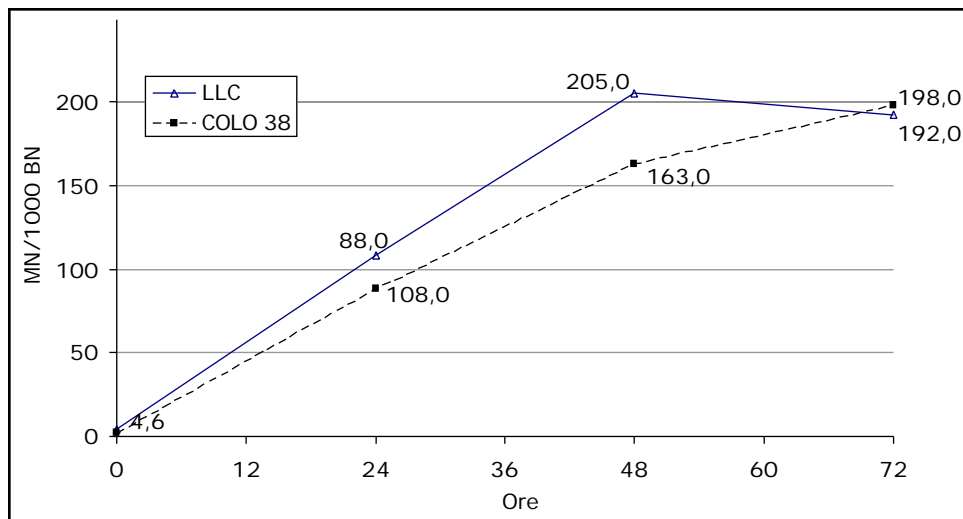


Figura 6. Cellule in coltura irradiate con una dose frazionata (3 x 4.7 Gy).

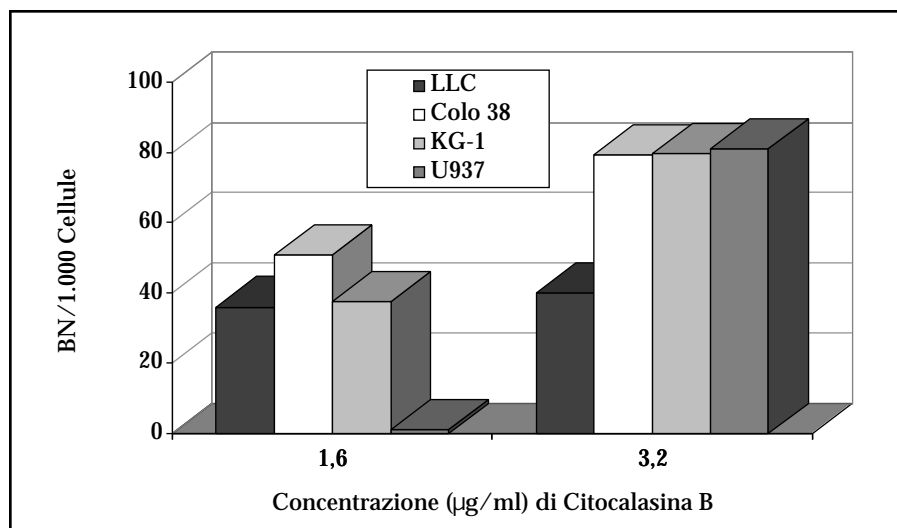


Figura 7. Influenza della Citocalasina B sulla percentuale di cellule binucleate (BN)

L'NDI o indice di divisione nucleare

Un importante beneficio del test CBMN è la possibilità di valutare l'estensione e progressione della divisione nucleare in una popolazione cellulare proliferante misurando la frequenza di cellule mononucleate, binucleate e multinucleate (con più di 2 nuclei), dopo un intervallo di tempo predefinito dall'aggiunta di Cito-B. L'indice di divisione nucleare (NDI) viene calcolato usando la formula proposta da Eastmond e Tucker nel 1989 (21):

$$NDI = (MI + 2MII + 3MIII + 4MIV) / N$$

dove da MI a MIV rappresentano il numero di cellule con uno fino a quattro micronuclei e N rappresenta il numero totale delle cellule contate.

L'NDI fornisce un dato molto importante sull'effetto citostatico di agenti chimici o fisici, può aiutare ad identificare molecole che stimolano la proliferazione cellulare, e quindi essere indirettamente utile per determinare la reattività dei linfociti stimolati con mitogeni. E' importante rilevare come tutte le citate informazioni possono essere ricavate dagli stessi vetrini utilizzati per contare i MN.

Osservazione di ponti nucleoplasmatici

Un'altra caratteristica del saggio CBMN, spesso non riportata, è la possibilità di osservare ponti nucleoplasmatici tra i nuclei delle cellule binucleate, fenomeno non evidenziabile, ovviamente, nelle cellule mononucleate. Osservazioni non pubblicate indicano un loro aumento a seguito dell'esposizione delle cellule a sistemi capaci di generare radicali liberi, come ad esempio le radiazioni ionizzanti o il perossido di idrogeno. Questo fenomeno non è stato sufficientemente indagato e sarebbe interessante utilizzare sonde per centromeri cromosoma-specifiche per verificare se ci sono centromeri all'estremità dei ponti (Fig. 8).

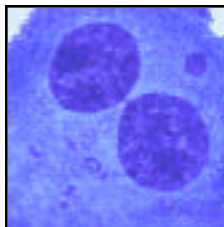


Figura 8. Cellula Colo 38 binucleata (melanoma maligno), irradiata con una dose di 10.12 Gy prima del trattamento con Cito-B. Da notare la presenza di un ponte nucleoplasmatico tra i due nuclei principali.

Eventi di escissione e riparo

La frequenza dei MN dopo esposizione ad una varietà di agenti genotossici dipende dal tipo di azione citotossica esercitata. Questa è bassa con prodotti chimici e radiazioni ultraviolette, che inducono soprattutto lesioni di basi e addotti sul DNA piuttosto che rotture di filamenti o danni del fuso mitotico; le spiegazioni vanno ricercate in un'efficace azione di riparazione delle lesioni indotte da questi agenti, o nel fatto che queste lesioni, se non riparate, non vengono convertite in un frammento a doppio filamento in seguito ad un ciclo di sintesi del DNA (condizione necessaria per la produzione di MN).

Fra le sostanze capaci di inibire i meccanismi di escissione e riparo, la citosin-araboside (Ara-C) opera in tal senso, come sotto esemplificato, inducendo un incremento delle aberrazioni cromosomiche nei linfociti umani esposti *in vitro* ad agenti chimici (Fig. 9).

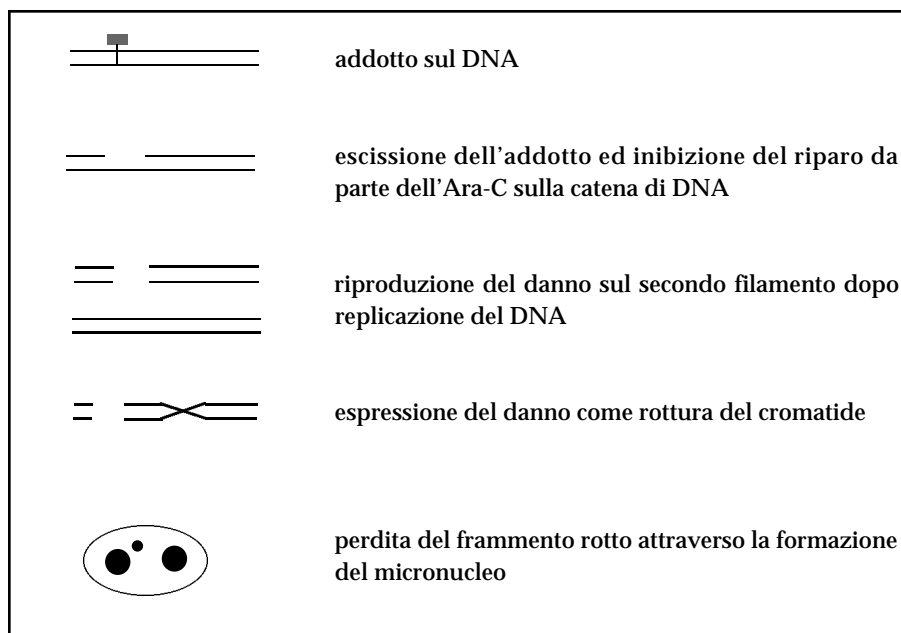


Figura 9. Rappresentazione schematica del possibile meccanismo d'azione della citosin-arabinoside.

Fenech e coll. hanno osservato che l'aggiunta di Ara-C, durante le prime 16 ore di coltura di linfociti esposti a raggi UV o a trattamento con metilnitrosourea, era in grado di produrre un incremento notevole (fino a 10 volte ed oltre) dell'espressione di MN; tale incremento era appena 1.8 volte superiore, come ci si aspettava, dopo esposizione a radiazioni ionizzanti (30, 31).

In definitiva, l'uso dell'Ara-C nel test dei MN è utile per valutare quegli agenti che producono un danno che viene comunque riparato (danno che altrimenti passerebbe inosservato), come nel caso di taluni pesticidi, oppure per distinguere questi agenti da quelli che operano diversamente.

Individuazione delle varianti linfocitarie HPRT

La metodica dei MN consente anche di individuare varianti HPRT con una sensibilità maggiore rispetto alla tecnica proposta da Strauss e Albertini nel 1979 (79) e basata sulla incorporazione di timidina tritiata.

Le varianti HPRT identificano dei linfociti resistenti alla 6-tioguanina, per una mutazione a carico del gene che codifica per l'ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasi. Queste cellule, utilizzate in laboratorio e in studi di mutagenesi (58), hanno l'abilità di dividersi almeno una volta quando incubate per 72 ore in presenza di 0.2 mM di 6-tioguanina. L'identificazione delle varianti HPRT risulta facile grazie al loro aspetto binucleato o multinucleato dopo stimolazione con mitogeno e trattamento con Cito B.

Valutazione di cellule apoptotiche

E' possibile anche valutare, sugli stessi vetrini impiegati per la conta dei MN, le cellule apoptotiche si da avere una stima globale dell'impatto genotossico della sostanza esaminata (1). Grazie alle caratteristiche morfologiche, le cellule apoptotiche vengono riconosciute come cellule piccole, con citoplasma condensato, colorate in violetto scuro; i nuclei mostrano aspetto variabile, a seconda dello stadio del processo apoptotico in cui si trovano, variando da un nucleo intero con cromatina condensata, altamente concentrata alla periferia, a materiale nucleare completamente disperso nel citoplasma (Fig. 10a e 10b).

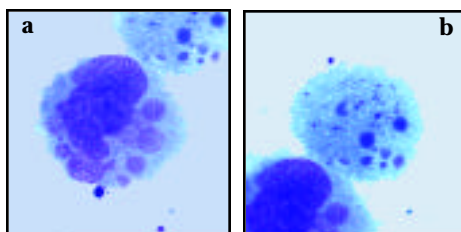


Figura 10a e 10b. Cellule che mostrano vari livelli di disgregazione del materiale nucleare.

Le cellule apoptotiche vengono contate al microscopio seguendo criteri definiti (23, 77, 54). La frequenza viene espressa come numero di cellule apoptotiche per 100 cellule (per ogni singolo dato vanno contate 1500 cellule). Il danno cellulare totale (TCD) rappresenta la somma delle cellule che appaiono micronucleate e delle cellule apoptotiche per 100 cellule (TCD%).

Occorre ricordare come, a seconda del tipo di insulto, della sua entità e durata, il destino della cellula varia: questa può subire un danno e ripararlo

immediatamente, oppure completare un ciclo mitotico e, eventualmente, esprimere uno o più MN, fino ad andare in apoptosi. Le condizioni di maggiore pericolosità sono legate al danno subito dalla cellula, non riparato e trasmesso alle cellule figlie: la presenza di MN suggerisce allora la possibile esistenza di mutazioni e rivela condizioni a rischio per l'individuo. Non a caso nei MN possono rilevarsi prodotti di geni correlati con la cancerogenesi, come la p53. L'entità "rischio" è poi correlata alla frequenza di MN (Fig. 11, 12 13 e 14).

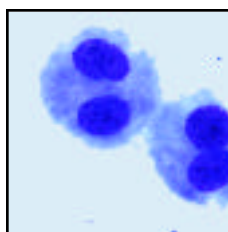


Figura 11. Cellule binucleate.

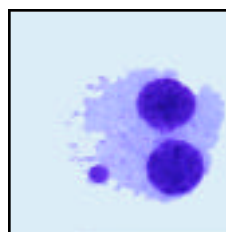


Figura 12. Cellule binucleata con micronucleo.

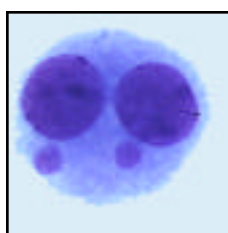


Figura 13 e 14. Cellule binucleate con due e tre micronuclei.

Eventi di mal-segregazione

Un vantaggio del saggio dei micronuclei è la capacità di individuare, in maniera reale, la perdita di cromosomi grazie alla presenza del MN; in effetti, l'assenza di un cromosoma in una metafase potrebbe molto verosimilmente essere dovuta ad un artefatto tecnico. Per stabilire se nel MN vi è un intero cromosoma si possono utilizzare anticorpi anticinetocore o sonde cromosoma-specifiche per il centromero che consentono, appunto, la identificazione della regione centromerica del cinetocore. L'uso di tali sonde permette non solo la individuazione di un intero cromosoma all'interno di

un MN, ma mostra anche la distribuzione di cromosomi tra i due nuclei principali di una cellula binucleata. La possibilità di documentare eventi di mal-segregazione, anche quando non si ha la formazione di MN, è offerta unicamente dal test CBMN e non è ottenibile con nessun'altra tecnica. Le cellule binucleate in telofase rappresentano, infatti, l'unico stadio in cui si può accertare se la distribuzione non bilanciata dei cromosomi sia dovuta ad una non disgiunzione o alla perdita del cromosoma nel micronucleo.

Il test immunoistochimico "CREST"

Associando al saggio CBMN il test immunoistochimico "CREST" che utilizza anticorpi "anticinetocore" (capaci di reagire in modo specifico con i cinetocori di cromosomi umani) ottenuti dal siero di pazienti con sclerodermia (che presentano calcinosi, fenomeno di Raynaud, discinesia esofagea, sclerodattilia e telangiectasia) è possibile discriminare tra MN cinetocore positivi, che contengono cromosomi interi, e MN cinetocore negativi, che contengono frammenti acentrici (34, 16, 84), ovvero distinguere l'effetto clastogeno da quello aneugenico di una determinata sostanza ad azione mutagena.

Sostanze come la vincristina, la vinblastina, la colchicina e il colcemid, il dietilsilbestrolo, la pedofillotossina, il fumo di sigarette, i particolati derivati dalla combustione diesel inducono, ad esempio, MN cinetocore positivi e sono, quindi, aneuplodizzanti.

I raggi X, il metilmetansulfonato inducono MN cinetocore negativi, per cui sono clastogeni.

Bisogna sottolineare che l'uso degli anticorpi CREST permette la visualizzazione delle proteine associate al cinetocore e non il DNA centromerico; ne consegue che se un mutagene induce perdita di cromosomi attraverso micronuclei con l'inattivazione o l'inibizione della formazione delle proteine del cinetocore, micronuclei centromero positivi potrebbero non essere evidenziati con il metodo CREST. E' quanto accaduto con sostanze come la mitomicina C o la 5-azacitidina, erroneamente considerate non aneugene con il metodo CREST perché agiscono sul cinetocore cui non possono più legarsi gli anticorpi specifici CREST.

L'etoposide, un inibitore della topoisomerasi II, induce MN cinetocore negativi (61-84%) e cinetocore positivi (26-39%), suggerendo che esso possiede attività sia clastogena che aneugenica (47).

Sostanze come la 5-azacitidina, il diazepam, la pirimetamina e l'idrochinone riducono la frequenza dei MN CREST-positivi (tab. 3).

I vetrini ottenuti per il test dei micronuclei con il blocco della citodieresi (CBMN) possono essere utilizzati anche per la metodica CREST previo 2 lavaggi degli stessi con PBS 0.1%.

1. Aggiungere una goccia (50 μ l) di anticorpi Crest, diluiti (1:1) con PBS 0.1%, sul vetrino
2. Appoggiare un coprioggetto (24 x 24 mm) sul vetrino e incubare a 37 °C per 1h in ambiente umidificato
3. Rimuovere il vetrino coprioggetto con cura e lavare 2 volte con PBS 0.1% (2' ogni lavaggio) ed asciugare
4. Aggiungere 50 μ l di anticorpi di coniglio anti-IgG umane coniugati con FITC, diluiti 1: 120 in PBS 0.5%, su vetrino
5. Montare il vetrino coprioggetto e incubare a 37 °C per 1h in ambiente deumidificato
6. Lavare 2 volte con PBS 0.1% (2' ogni lavaggio) ed asciugare
7. Aggiungere 2 gocce di DAPI (2.5 μ g/ml) in una soluzione idonea per preservare la fluorescenza

* I vetrini marcati vanno osservati immediatamente o conservati a 4°C al buio.

Tabella 3. Metodica CREST per micronuclei contenenti cinetocore²¹.

L'esame FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)

L'ibridazione *in situ* è una tecnica che fa da ponte tra la biologia molecolare e le discipline morfologiche come la citologia, l'istopatologia e la citogenetica. Essa somiglia molto alla immunocitochimica, con la differenza che l'anticorpo è sostituito da una sonda di acido nucleico. Infatti, mediante questa metodica, sia il DNA che l'RNA possono essere individuati all'interno di cellule e su sezioni di tessuto congelate o fissate e incluse. L'ibrido sonda-bersaglio viene dimostrato *in situ* con tecniche autoradiografiche, se la sonda è marcata con un radioisotopo, o mediante microscopia ottica o microscopia a fluorescenza se la sonda è marcata con biotina, digoxigenina o un tracciante fluorescente.

L'ibridazione *in situ* con l'uso di sonde specifiche consente di ottenere ulteriori informazioni circa il materiale contenuto nel micronucleo, e quindi circa la specificità del danno e la regione genica coinvolta. L'uso di sonde di DNA ("DNA probes"), dirette specificamente contro sequenze ripetitive presenti unicamente nella regione centromerica del cromosoma (sonde alfoidi pancentromeriche), risulta essere il metodo più accurato per distinguere eventi clastogeni da eventi aneugenici. La combinazione di sonde centromeriche e telomeriche migliora ulteriormente l'accuratezza del metodo (55).

Tuttavia, rotture nella regione cromosomica, che è complementare alla sonda (generalmente eterocromatica) possono essere falsamente interpretate come un cromosoma addizionale. Questo ostacolo può essere aggirato con una marcatura *a tandem* (18), che si ottiene con la simultanea ibridazione con una sonda per il satellite alfa, che marca una piccola regione adiacente alla regione eterocromatica ma è meno suscettibile a rotture, ed una sonda diretta verso la parte eterocromatica (per esempio le sonde per il satellite III).

Oltre ad utilizzare sonde per tutte le regioni centromeriche (sonde alfoidi totali), possono essere utilizzate sonde centromeriche cromosoma specifiche (sonde alfoidi cromosoma specifiche) con gli ovvi vantaggi (41). Hando *et al.* (1994) e Catalan *et al.* (1995) hanno dimostrato che la maggiore percentuale di MN riscontrabile nelle donne via via che vanno avanti con l'età è dovuta, preferenzialmente all'eliminazione del cromosoma X *late replicating*, perdita dalla quale le cellule traggono un vantaggio selettivo.

La caratterizzazione dei micronuclei con tecniche di ibridazione *in situ* rende il saggio CBMN molto accurato e specifico, ma richiede anche molto lavoro e tempo, oltre ad essere estremamente dispendioso. Queste problematiche potranno trovare soluzione col ricorso a sonde umane marcate con fluorocromi, ormai commercialmente disponibili, e l'applicazione di tecniche automatizzate (tab. 4). L'uso delle tecniche di citogenetica molecolare da parte di diversi gruppi di studiosi ha permesso lo studio dell'esposizione a basse concentrazioni di sostanze chimiche aneuplodizzanti, la costruzione di curve dose-risposta (12) e la discriminazione tra i due principali meccanismi inducenti l'aneuploidia: a) la perdita di cromosomi (si allontanano dalla piastra metafasica durante i movimenti dell'anafase); b) la non disgiunzione cromosomica (mancata segregazione dei due cromatidi fratelli) (19, 56, 24, 20, 88). Infatti l'associazione del CBMN all'uso di sonde per il centromero consente la simultanea evidenziazione di eventi di non disgiunzione nei nuclei in interfase e di perdita di cromosomi nei micronuclei, nonché consente di calcolare l'entità della perdita e non disgiunzione di cromosomi (tab.5) (98). Utilizzando questa metodologia, Kirsch-Volders *et al.* (50) hanno analizzato la capacità delle radiazioni ionizzanti di indurre tale tipo di eventi, riscontrando un incremento statisticamente significativo per i diversi *endpoints* citogenetici con l'aumento della dose di radiazioni. E' stato anche possibile chiarire il quesito se l'induzione dell'aneuploidia possa essere rappresentata da una curva dose-risposta a partire da un determinato valore soglia. Da un punto di vista teorico, è noto che i mutageni che possono indurre una lesione dopo interazione con un singolo target, ad esempio un legame covalente con il DNA, mostrano una curva dose risposta senza un determinato valore soglia; quindi, potenzialmente, una lesione del DNA che non è riparata, diventa una mutazione. Alternativamente, mutazioni che richiedono il coinvolgimento di più di un target potrebbero seguire curve valore soglia dipendenti (3, 15, 63).

<p>Genomiche totali (<i>chromosome painting</i>)</p>	<p>consentono di “colorare” un’intera coppia di autosomi ed i cromosomi sessuali.</p> <p>Utilizzo: rilevano aberrazioni strutturali in piastre metafasiche (traslocazioni, delezioni).</p>
<p>Alfoidi cromosoma specifiche</p>	<p>consentono di “colorare” la zona centromerica di una coppia di cromosomi e dei cromosomi sessuali.</p> <p>Utilizzo: rilevano aneuploidia rispetto a specifici cromosomi; si possono impiegare sia in nuclei interfasici che in piastre metafasiche.</p>
<p>Alfoidi totali</p>	<p>o pancentromeriche consentono di “colorare” la zona centromerica di tutti i cromosomi.</p> <p>Utilizzo: alternativa alla tecnica CREST.</p>

Tabella 4. Sonde utilizzate in FISH (Fluorescence In Situ Hybridation).

<p>La sonda alfoide pancentromerica viene preparata ricorrendo alla tecnica di amplificazione in vitro mediante PCR descritta da Weier <i>et al.</i> (1991).</p> <p>Prima dell’ibridazione i vetrini vengono pretrattati con pepsina (100 µg/ml 0.1 M HCl) a temperatura ambiente per 10’, quindi, fissati con paraformaldeide al 4% in PBS contenente 50 mM di MgCl₂ per stabilizzare il citoscheletro prima della fase di denaturazione a 72 °C.</p> <p>Per l’ibridazione, l’individuazione e l’amplificazione del segnale emesso dalla sonda alfoide totale, marcata con digoxigenina, si segue la metodica descritta da Bauchinger <i>et al.</i> (1993).</p> <p>Per la colorazione di contrasto, si usa lo ioduro di propidio (1 µg/ml).</p>

Tabella 5. Ibridazione in situ con sonda alfoide pancentromerica (sec. Huber *et al.* 1996).

Il bandeggio C

Secondo Vanderkerken *et al.* (1989), la percentuale dei MN con bande positive al bandeggio C, insieme alla misurazione dell'area dei MN e del contenuto di DNA, rappresentano i tre criteri per distinguere gli agenti clastogeni da quelli aneugenici.

Il bandeggio C mette in evidenza l'eterocromatina pericentromerica, colora le porzioni altamente ripetitive ed il DNA-satellite che non vengono trascritte, ed individua falsi negativi dovuti ad una interazione diretta o indiretta dei prodotti chimici esaminati con le proteine del cinetocore (87). Anche questa tecnica presenta però alcuni limiti, dal momento che non è in grado di individuare il cromosoma Y nei topi a causa della mancanza di eterocromatina C in questo cromosoma, e non è applicabile in specie animali nelle quali vi siano bande di eterocromatina C intercalari.

Per quanto concerne gli altri due criteri per la caratterizzazione dei MN, le correlazioni tra area, contenuto di DNA e presenza del centromero è stata confermata grazie ad osservazioni condotte *in vivo* ricorrendo a metodiche di analisi di immagini (91, 89, 71) e analisi in citometria a flusso (60, 55, 38) su MN del midollo osseo di topo. In questo animale, i cromosomi sono acrocentrici e hanno misure simili. La relazione di misura tra un cromosoma di dimensioni medie ed un frammento di dimensioni medie è di circa 2:1, il che permette l'individuazione di differenze in misura o in contenuto di DNA dei MN. E' stato ripetutamente dimostrato che entrambi i parametri sono informativi, in quanto esiste una buona correlazione tra misura e contenuto di DNA dei MN (87, 55).

Nelle cellule umane, essendovi cromosomi metacentrici, la relazione tra un cromosoma medio ed un frammento medio è di 4:1, per cui esiste una maggiore possibilità di discriminazione dei tipi di MN in base all'area o al contenuto di DNA. Tuttavia, la consistente variazione di lunghezza tra i cromosomi e la fase del ciclo cellulare al momento dell'analisi potrebbe impedire una corretta valutazione. Van Hummelen *et al.* (88) hanno dimostrato che la distribuzione del DNA nei MN di linfociti, indotti da clastogeni e da aneuplodizzanti, dipende fortemente dalla quantità dei MN in G₁ e G₂ nei campioni misurati. I micronuclei indotti da effetti clastogeni sono in genere più piccoli di quelli conseguenti ad eventi aneugenici. La classificazione dei MN sulla base del valore dell'area da solo non è realizzabile per le culture *in vitro* di linfociti poiché non esiste una correlazione lineare tra area nucleare e contenuto di DNA (89).

In uno screening di routine condotto per evidenziare il potenziale mutagenico e aneuplodizzante di sostanze chimiche la determinazione del contenuto di DNA e dell'area dei MN può essere un metodo efficiente per

stimare il contenuto e l'origine dei MN. In questi casi, la citometria a flusso (37, 73, 60, 39; 44) e l'analisi di immagini (17, 82, 10) permettono misure automatiche di un gran numero di MN e quindi la possibilità di analisi statistiche (85).

A titolo riepilogativo vengono in seguito riportati i vantaggi e gli svantaggi dei principali tests esaminati (tab. 6, 7 e 8).

Vantaggi

- rapidità
- semplicità
- buona riproducibilità
- costo contenuto
- possibilità di distinguere gli eventi clastogeni da quelli aneugenici (insieme alle tecniche FISH/CREST)
- non richiede una speciale preparazione
- è un test ottimale di pre-screening o preliminare allo studio delle aberrazioni cromosomiche
- consente lo screening di un grosso numero di cellule, il che facilita gli studi su popolazione accidentalmente o professionalmente esposta ad agenti genotossici
- i preparati (vetrini) si conservano a lungo e possono essere utilizzati per altri approfondimenti (FISH)
- possibilità di automazione
- richiede una piccola quantità di sangue

Svantaggi

- alta variabilità inter-laboratorio e inter-individuale circa la frequenza di MN (mancanza di procedure standard)
- impossibilità a determinare il tipo di aberrazioni cromosomiche
- presenza di vari fattori di confondimento, in primo luogo età e sesso
- non applicabile per indagare su passate esposizioni dal momento che i MN originano da aberrazioni instabili
- possibilità che la popolazioni di cellule binucleate studiata non sia rappresentativa dell'intera popolazione

Tabella 6. Test CBMN: vantaggi e svantaggi.

<p><u>Vantaggi</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • metodo rapido, di facile esecuzione e costo contenuto • può essere usato in tutti i sistemi cellulari • conserva abbastanza la morfologia cellulare e la cromatina • i segnali hanno una qualità confrontabile per tutti i cromosomi <p><u>Svantaggi</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • possibili errori nell'interpretazione dei risultati in caso di agenti che alterano il cinetocore • non può essere usato per preparazioni fissate con acidi • richiede una speciale conservazione dei vetrini • problemi di penetrazione non vengono superati dal ricorso a proteinasi e/o detergenti forti • sieri differenti di pazienti possono mostrare significative differenze nella composizione anticorpale

Tabella 7. CREST: vantaggi e svantaggi.

<p><u>Vantaggi</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • facile da usare • non richiede particolari cure per la conservazione di vetrini per un uso a breve termine • problemi di sonde e penetrazione superabili dal ricorso a proteinasi e/o detergenti • possono essere preparate sonde senza grossi problemi per la loro quantità e variabilità • i vetrini possono essere allestiti da tecnici citogenetisti • i segnali sono di solito molto forti <p><u>Svantaggi</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • possibili errori nell'interpretazione di risultati in caso di agenti che causano rotture a livello dei siti di legami sulle sonde • le sonde di DNA sono in genere specie-specifiche • alcune sonde non marcano tutti i cromosomi • i segnali sono di diversa qualità in cromosomi differenti più costoso e laborioso del metodo CREST • la procedura di denaturazione possono alterare la morfologia cellulare

Tabella 8. FISH: vantaggi e svantaggi.

In conclusione, la recente associazione del test CBMN a tecniche di genetica molecolare (come il metodo FISH) ha incrementato e continuerà ad incrementare il potere di risoluzione e la validità della metodica. Ricorrendo infatti ad un'appropriata combinazione di sonde geniche è possibile discriminare tra eventi clastogeni ed eventi aneugenici (marcatura tandem centromerica/pericentromerica o marcatura centromerica/telomerica di MN) o tra perdita di cromosomi e mancata separazione di cromosomi (doppia marcatura nei MN in interfase), od ancora si possono individuare cromosomi specifici bersaglio dell'insulto genotossico. Un corretto comportamento sarebbe: eseguire il test CBMN; se questo risulta negativo, il composto analizzato non dovrebbe presentare attività clastogena né un potenziale aneugenico; se invece esiste un incremento dei MN, è allora necessario determinare se esso sia dovuto all'uno o all'altro tipo di effetti.

Il test CBMN come strumento biodosimetrico

Il test CBMN su linfociti di sangue periferico è particolarmente utile come strumento biodosimetrico anche in soggetti esposti per motivi terapeutici, come nel caso si voglia determinare la risposta individuale in funzione delle diverse condizioni di irradiazione (volume irradiato, qualità della radiazione, modalità di frazionamento della dose).

Osservazioni protratte nel tempo consentono di evidenziare la capacità individuale di recupero del danno e, cosa particolarmente importante in pazienti giovani, la predisposizione a sviluppare danni tardivi. Infatti, la persistenza di danni cromosomici potrebbe essere l'evento iniziale nei processi che inducono alla fine lo sviluppo di un cancro secondario e la rivelazione di danni genetici nei linfociti di sangue periferico potrebbe riflettere danni cromosomici in altre cellule somatiche. Inoltre, la preventiva conoscenza della radiosensibilità intrinseca del soggetto potrebbe suggerire se avviare o meno il paziente a terapia con frazionamenti accelerati o a trattamenti integrati radio-chemioterapici, considerando che nell'uno e nell'altro caso gli effetti acuti sono generalmente esaltati. In breve, il test dei MN potrebbe fornire nel campo della radioterapia indicazioni di notevole interesse mirate alla valutazione:

1. della dose biologica ricevuta dal paziente;
2. della risposta individuale;
3. dell'effetto ottenuto in diverse condizioni di irradiazione;
4. dell'azione combinata di radio e chemioterapia (12).

Oltre a dosare la sensibilità individuale del soggetto sottoposto a chemio e/o radioterapia il saggio CBMN può misurare la chemio e radio-sensibilità del tumore. Fino a qualche tempo fa, il saggio standard per valutare la radiosensibilità era la misura *in vitro* della sopravvivenza cellulare.

Tale tecnica presenta diversi svantaggi: un lungo intervallo di tempo per completare un saggio clonogenico, la bassa efficienza nella formazione di piastre, e diversi artefatti, laddove il test CBMN è molto rapido, essendo sufficiente il tempo necessario perché la cellula abbia una mitosi.

Il numero dei MN aumenta con la dose di irradiazione, come suggerito dagli istogrammi sotto riportati e ripresi da studi effettuati nel nostro laboratorio.

Alle dosi più elevate si riscontrano degli artefatti imputabili all'induzione di fenomeni apoptotici e morte di molte cellule in coltura (Fig. 15 e 16).

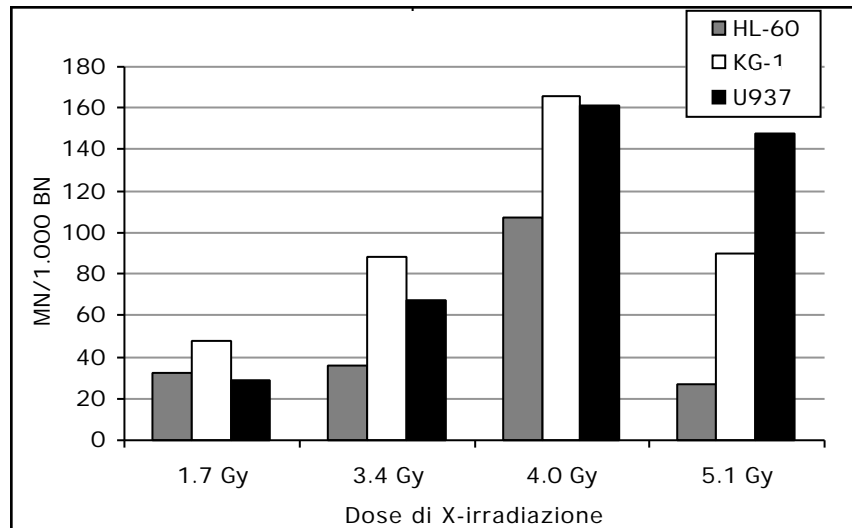


Figura 15. Cellule in coltura esposte a X-irradiazione.

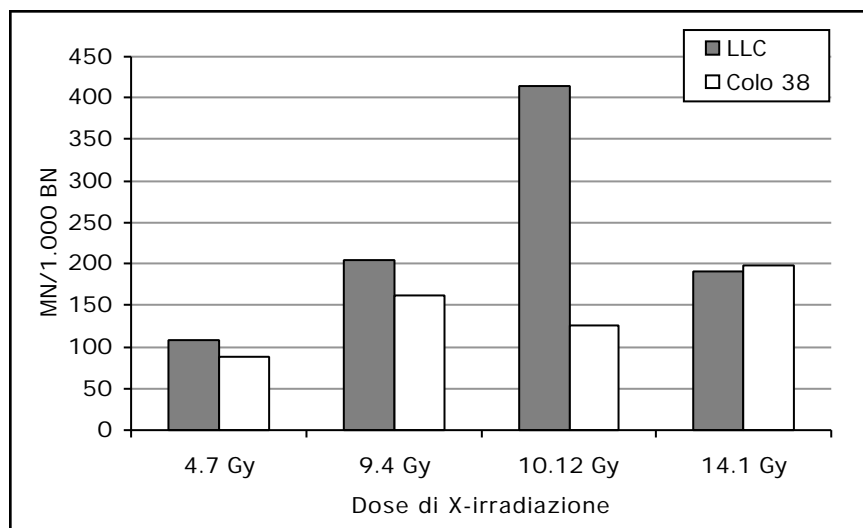


Figura 16. Cellule in coltura esposte a X-irradiazione.

Valore predittivo della positività degli indicatori citogenetici

E' ormai accettato il valore predittivo della positività degli indicatori citogenetici (in primo luogo AC, più utilizzate allo scopo), nel senso che un significativo loro aumento sia indicativo di aumentato rischio di tumori, anche se a livello di gruppo più che a livello individuale (2). Recenti studi epidemiologici cooperativi sembrano tuttavia confermare che, nell'ambito di tali gruppi, i sottogruppi che presentano frequenze più elevate di AC (ma non di SCE) sono a maggior rischio di tumore rispetto ai sottogruppi con frequenze medio-basse (42, 8). Va però precisato che molti degli studi pubblicati sulla frequenza di AC e di SCE in soggetti esposti a chemioterapici antitumorali presentano risultati non univoci, imputabili verosimilmente ad una serie di condizioni, fra cui differenti situazioni di esposizione studiate, esiguità di casistica, problemi metodologici.

I lavori positivi per aumento di AC e negativi per aumento di SCE si riferiscono, ad esempio, a situazioni bonificate, con esposizione pregressa maggiore di quella in corso. In questi casi, data la bassa frequenza di aberrazioni cromosomiche osservata nei diversi studi, il metodo risulta poco sensibile; inoltre, per basse esposizioni, occorre studiare un numero elevato di soggetti (esposti e controlli) e/o di metafasi, il che, considerata la laboriosità ed il costo elevato del metodo, rende il test poco adatto per indagini su larga scala.

Personale professionalmente esposto

Da una revisione critica della letteratura, per quanto attiene il personale professionalmente esposto perché addetto alla manipolazione di farmaci antitumorali in reparti oncologici, emerge che risultati positivi sono stati riscontrati soprattutto nel personale infermieristico esposto senza utilizzare adeguate protezioni (97, 4).

In particolare per le AC, che tendono a persistere nel tempo, la positività di tale indicatore nel gruppo rappresentava l'effetto di esposizioni pregresse, come risulta evidente, ad esempio, dal lavoro di Oestreicher *et al.* (1990), in cui gli infermieri, che avevano manipolato per anni farmaci antitumorali senza precauzioni fino a 3-4 mesi prima dell'esecuzione del test, presentavano un aumento significativo di AC di tipo cromosomico, ma non di SCE (indicatore più sensibile, ma meno persistente), rispetto al personale di farmacia, che aveva sempre lavorato in condizioni protette, e rispetto agli infermieri

non coinvolti nella manipolazione di antitumorali. In tali operatori, la pratica del fumo di sigarette aveva un effetto additivo sulla frequenza di AC (74).

A convalida del lavoro su riportato di Anwar e coll., uno studio prospettico di Roth *et al.* (1994) ha confermato la negatività ai test per AC, SCE e MN in un gruppo di 6 farmaciste ospedaliere non fumatrici, studiate prima e dopo un anno di manipolazione di antitumorali in condizioni di lavoro protette e confrontato con un gruppo di 6 controlli appaiati non esposti a citostatici; anche in questo caso, però, l'osservazione di talune variazioni nel tempo, sia negli esposti che nei controlli, dei parametri valutati sottolinea le difficoltà interpretative dei dati in studi longitudinali, specialmente quando condotti su piccoli numeri.

Per quanto riguarda gli studi su effetti citogenetici (AC e SCE) in lavoratori dell'industria farmaceutica potenzialmente esposti a citostatici, esistono due lavori. Il primo, relativo a lavoratori di impianto pilota e di laboratori chimici esposti a nuovi agenti citostatici, principalmente agenti alchilanti, ha riportato risultati positivi, anche al test di mutagenesi urinaria (65). Il secondo, relativo a gruppi di lavoratori di un'industria finlandese produttrice di ciclofosfamide, potenzialmente esposti in diverse fasi del ciclo lavorativo, ha riportato risultati negativi sia al test della mutagenesi urinaria che agli indicatori AC o SCE (76).

Due piccoli sottogruppi, studiati con il test dei CBMN, e riportati anche da Yager *et al.* (1988), sembrano dimostrare un *trend* verso la positività. Tuttavia, il piccolo numero di controlli, e la presenza tra gli esposti di singoli soggetti di sesso femminile con valori molto elevati, suggerisce grande cautela, ancora una volta, nell'interpretazione dei risultati.

Aumento di aberrazioni, prevalentemente di tipo cromosomico, è stato infine osservato in lavoratori dell'industria farmaceutica esposti a bisclorotil-nitrosourea (BCNU), oltre che a solventi vari, e in un gruppo con potenziale esposizione professionale ad antracicline, studiati rispettivamente negli anni 1975-78 e 1983 (33).

Per concludere, vanno citati i lavori di Sarto *et al.* (1987), Thiringer *et al.* (1991) e più recentemente di Machado-Santelli *et al.* (1994) che hanno valutato la frequenza di MN in infermiere professionalmente esposte, sempre perché addette alla manipolazione di farmaci antitumorali, evidenziando che le cellule della mucosa orale sono un bersaglio diretto per detti agenti (inalazione dei farmaci per assenza o uso di inadeguati mezzi di protezione). Il saggio dei MN in cellule esfoliate della mucosa orale appare pertanto molto sensibile e capace di registrare l'effetto di basse dosi di carcinogeni ambientali (ad es., il fumo di 20 sigarette al giorno) (tab. 9).

La frequenza di micronuclei in cellule esfoliate dalla mucosa orale è indice del danno genotossico spontaneo e può essere utile per valutare l'attività protettiva di sostanze quali i retinoidi, il β -carotene, ecc., sul danno stesso.

Le cellule esfoliate della mucosa orale vengono ottenute con un gentile "scraping" a livello delle guance, destra e sinistra, utilizzando un vetrino pulito secondo quanto indicato da Stich e coll. (1982) con modifiche; in alternativa, per si può utilizzare un "cellscraper" sospendendo le cellule ottenute in una provetta contenente terreno di coltura.

I vetrini vengono immersi in 8 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0.9%) e portati immediatamente in laboratorio. Le cellule sono fatte precipitare dalla sospensione (10 minuti, 1200 rpm) ed il "pellet" viene fissato in metanolo/acido acetico (3:1) due volte per 5 minuti. Si versano quindi alcune gocce della sospensione cellulare su vetrini puliti bagnati e freddi. Dopo 24 ore i vetrini vengono colorati usando Giemsa 1:10. Per ciascun individuo vengono valutate 1000 cellule, seguendo i criteri suggeriti da Sarto *et al.* (1987) e Torbert *et al.* (1992).

Tabella 9. Il test dei micronuclei su cellule esfoliate della mucosa orale.

Il test dei MN appare utile anche per definire strategie di chemioprevenzione, allorché si tenta di prevenire l'insorgenza del cancro in persone ad alto rischio attraverso l'uso di sostanze chimiche naturali, come ad esempio in pazienti trattati per carcinomi testa-collo; questi individui presentano un rischio elevato di sviluppare un secondo tumore primario a carico del tratto digestivo superiore o del tratto respiratorio superiore. Hong *et al.* (1990) hanno dimostrato che somministrando acido 13-*cis*-retinoico è possibile ritardare, e talvolta prevenire, l'insorgenza di tumori primari multipli. In questi casi, la frequenza di MN riflette la risposta terapeutica.

Valutazione della frequenza di micronuclei nell'anziano

L'età rappresenta il maggior fattore di confondimento nel valutare la frequenza di micronuclei. Eppure, proprio questa osservazione potrebbe rappresentare uno dei campi di maggior interesse per l'applicazione della metodica nel prossimo futuro, soprattutto se saranno portate avanti strategie di chemioprevenzione.

Il bisogno, e di conseguenza la domanda, di salute si è venuta infatti diversificando negli ultimi anni sulla base dell'evoluzione del quadro demografico, per cui le società economicamente evolute stanno diventando una popolazione di anziani, e del quadro nosologico, che risente sempre più dei "fattori sociali" (il contesto ambientale e di lavoro, il tipo di vita).

Ne deriva che la crescita dell'età media dei cittadini rappresenta oggi il principale generatore dell'aumento del costo della spesa sanitaria, anche perché gli anziani sono interessati essenzialmente da patologie cronicodegenerative e richiedono un'assistenza continuata e sempre più costosa. Le due principali cause di morte sono rappresentate dalle malattie del sistema circolatorio (45%) e dai tumori (26%). Tuttavia, mentre la mortalità per malattie del sistema circolatorio è in consistente decremento, quella per tumori mostra un incremento progressivo, con una maggiore accentuazione negli ultimi decenni. Inoltre, la frequenza dei tumori varia in funzione delle diverse fasce d'età: le persone più anziane (età > 65 anni) presentano un rischio dieci volte maggiore di sviluppare un tumore rispetto ai più giovani. Tutto ciò ha portato una maggiore attenzione della società intera verso le problematiche dell'anziano.

La senescenza è in effetti una condizione involutiva nella quale decresce la vitalità e si accentua la vulnerabilità in funzione del progredire dell'età cronologica. Essa però si manifesta con velocità e gravità diverse nei differenti individui come pure nei differenti organi ed apparati corporei, per cui presenta andamenti diversi nei vari organismi: il risultato complessivo resta sempre una maggiore "fragilità biologica". In considerazione di tale variabilità, negli ultimi anni molti tentativi sono stati condotti per individuare i segnali biologici dell'invecchiamento (*biomarkers of aging*) e quindi distinguere l'età biologica dell'uomo da quella cronologica.

Secondo recenti acquisizioni la causa primaria della senescenza sarebbe da individuare nelle aberrazioni che intervengono nei cromosomi dell'uomo e dei modelli animali (40). Più in particolare la senescenza delle cellule viene rapportata ad una ridotta capacità riparativa del DNA da parte dell'individuo (96), come suggerito anche da un incremento della frequenza di MN con l'avanzare dell'età (96, 81).

Deficit della capacità riparativa dell'individuo si osservano infatti in talune sindromi genetiche (46), come talune sindromi di senescenza precoce (es., sindrome di Werner, età media 34 anni; atassia-telengectasia, età media 16 anni). Tale deficit è maggiormente evidenziabile in condizioni di stress, anche riprodotte artificialmente, come ad esempio esponendo le cellule in coltura dell'individuo a radiazioni gamma (35, 36).

Sperimentalmente, vita media e durata del ciclo cellulare sono i due parametri tipici sulla cui base può essere determinato lo stato di senescenza delle cellule. Detti parametri correlano con l'età del donatore (45).

A causa dei danni cromosomici non riparati proprio per favorire la riparazione, il ciclo cellulare rallenta via via; in taluni casi, il ciclo rallenta fino a quando l'attività mitotica cessa del tutto e la cellula muore. La sequenza di questi eventi, molto rapida nel caso delle sindromi citate, si ripropone nell'individuo "normale" anche se con una tempistica diversa. Nell'uno o nell'altro caso il risultato non cambia ed è rappresentato dalla senescenza.

La sindrome di Werner, caratterizzata da un deficit della capacità riparativa dei danni a carico del DNA, con accumulo di aberrazioni cromosomiche e quindi un grosso ritardo del ciclo cellulare, rappresenta un modello esasperato di quello che accade "normalmente" nel processo di senescenza. In linea con le osservazioni condotte in tale sindrome, la senescenza è causata dall'esaurimento, nel corso della vita, di due meccanismi: quelli che controllano la riparazione del DNA, per eliminare i danni genetici; e quelli che controllano la durata del ciclo cellulare, per dare agli enzimi di riparazione il tempo di lavorare. Mutazioni a carico dei geni responsabili della riparazione del DNA o dell'adeguamento del ciclo cellulare causano malattie genetiche associate a senescenza precoce: nella sindrome di Cockayne e della sindrome di Down l'insufficienza dei meccanismi riparazione del DNA produce prematuramente un ritardo del ciclo cellulare. Nell'ataxia-telengectasia il difetto di uno dei meccanismi di riparazione del DNA pare aggravato dalla incapacità di ritardare il ciclo cellulare di conseguenza. La sindrome di Werner associa un esasperato ritardo del ciclo cellulare e una ridotta capacità riparativa del DNA.

Basandosi sull'osservazione che la frequenza di MN spontanei o indotti da raggi in donatori (individui normali) è specificamente più elevata negli anziani rispetto ai giovani, è stato condotto uno studio su donatori, distinti per fasce d'età e sottoposti a trattamento con un complesso vitaminico-agenti antiossidanti (vit. A, C, E, β -carotene, acido folico, rutina (36). E' stato così dimostrato che è possibile ridurre significativamente la formazione spontanea di MN con appena 4 mesi di trattamento. Ciò dimostra quindi che è possibile intervenire sul processo di invecchiamento cellulare e ritardarlo, riducendo i danni genetici prodotti da fattori esogeni e/o endogeni nei linfociti umani. La materia è però molto complessa, come suggerito dall'osservazione che:

1. l'impatto di micronutrienti sulla frequenza di danni genetici differisce a seconda del sesso dell'individuo;
2. alti livelli di vit. C e bassi livelli di B₁₂ sono associati ad elevata frequenza di MN nei giovani maschi;
3. bassi livelli di B₁₂ e di folati sono correlati ad un aumento dei MN nelle giovani donne (31).

Conclusioni e prospettive

Molti anni sono trascorsi da quando Fenech e Morley, nel 1985, introducendo l'uso della citocalasina B, una sostanza che inibisce la citodieresi senza inibire la mitosi, offrirono alla comunità scientifica un sistema semplice ed efficace per identificare le cellule che erano andate incontro ad un ciclo mitotico, dopo esposizione ad agenti genotossici in studi di danni cromosomici. Tali cellule apparivano binucleate e, laddove il materiale genetico risultava alterato veniva eliminato in una sorta di piccolo nucleo, o micronucleo. Da allora le conoscenze si sono di molto accresciute, tanto che oggi il metodo CBMN occupa un posto di rilievo tra i vari indicatori citogenetici in quanto:

1. rappresenta un esame semplice, rapido e riproducibile;
2. richiede tempi brevi di osservazione;
3. consente di identificare e quindi contare (NDI) le cellule che non si sono divise in coltura, le cellule che si sono divise una sola volta, e quelle che si sono divise più di una volta;
4. consente la stima parallela (sullo stesso campione di cellule in coltura) di:
 - ritardo mitotico (frequenza di cellule binucleate);
 - rottura/perdita di cromosomi (frequenza di MN con o senza marcatura del centromero/cinetocore);
 - non disgiunzione di cromosomi (distribuzione di doppia marcatura in macronuclei di cellule binucleate);
 - apoptosi (frequenza di nuclei condensati);
5. grazie ad un'affidabile risoluzione biodosimetrica permette la costruzione di curve dose-risposta e quindi la stima della dose assorbita dal bersaglio, della sensibilità intrinseca dell'individuo, dei tempi necessari per la riparazione del danno indotto a carico del DNA;
6. si presta all'automazione, per cui si candida a test di prescreening con la considerazione che la aspecificità che lo contraddistingue (non si sa cosa viene eliminato nel micronucleo) può essere superata, al bisogno, associando ad esso altre tecniche (test immunoistochimico "CREST", esame FISH -Fluorescence *in situ* hybridization-).

In conclusione, i MN vengono oggi ritenuti dei validi indicatori indiretti di aberrazioni cromosomiche. I limiti sono ancora molti, ma certamente il più rilevante è rappresentato dalla indisponibilità di tecniche automatizzate, che ne consentano l'impiego in indagini su grossa scala e studi di prescreening, capaci di valutare l'efficacia di detto parametro su una popolazione anche per numero rappresentativa.

I tentativi eseguiti fino ad oggi per automatizzare la conta dei MN sono stati molteplici, ma il risultato non è riuscito a varcare i confini del laboratorio in cui la nuova tecnica era stata messa a punto. Gli approcci seguiti sono stati essenzialmente due:

- l'analisi di immagini, in cui si è cercato di automatizzare soprattutto la conta dei MN eseguita sempre ricorrendo a vetrini preparati dall'operatore (64, 32, 82, 10, 92, 6, 7);
- la citometria a flusso (72, 73, 93, 59). Ques'ultima può essere eseguita in combinazione con la FISH su MN separati usando sonde di DNA specifiche dirette verso il centromero ed il telomero cromosomiale (57, 55, 22, 61) o l'intero cromosoma (75). I vantaggi di tale metodica sono evidenti: il grosso numero di cellule che possono essere analizzate in un breve intervallo di tempo; i criteri apparentemente obiettivi per identificare i MN in sospensione. Esistono però anche taluni svantaggi, tra cui il maggiore è senza dubbio rappresentato da taluni artefatti (detriti cellulari, corpi apoptotici, nuclei frammentati, ecc.), nel senso che non tutte le particelle identificate sono effettivamente MN o cellule micronucleate. Occorre tener presente, inoltre, che vengono contati degli "eventi" ed esiste un'eccessiva dipendenza dei risultati dalle decisioni degli operatori; quindi l'impiego della tecnica citofluorimetrica classica non consente determinazioni attendibili quanto la tecnica di conta dei MN al microscopio effettuata da operatori esperti.

La condizione ottimale sarebbe costituita dall'associazione delle due metodiche, ovvero dalla disponibilità di uno strumento che associ la conta automatizzata dei MN all'analisi delle loro immagini. In questo modo la metodica può essere standardizzata e non richiedere personale molto esperto. Tale strumento innovativo è in allestimento, come prototipo, presso i laboratori degli Autori in collaborazione con una multinazionale.

Ringraziamento: I dati presenti nella monografia sono stati ottenuti grazie al finanziamento del Ministero della Sanità.

Glossario

Aberrazioni	cromosomiche: variazione rispetto al normale sia del numero (aberrazioni numeriche) che della struttura dei cromosomi (aberrazioni strutturali)
Aberrazioni	numeriche o quantitative: vedi a) aneuploidia, b) poliploidia
Aberrazioni	strutturali o qualitative: <ul style="list-style-type: none"> • stabili: traslocazioni, inversioni, isocromosomi, delezioni; • instabili: dicentrici, anelli, frammenti acentrici, figure tri-tetradiali
Acentrico	frammento di cromosoma o cromosoma privo di centromero (vedi traslocazione).
Anafase	stadio della mitosi in cui i cromosomi figli legati alle fibre del fuso migrano ai due poli opposti della cellula
Aneugenico Aneuploidia	agente chimico o fisico in grado di indurre aneuploidia variazione in più o in meno di uno o pochi cromosomi rispetto all'assetto cromosomico normale (diploide, $2n$). Poiché cromosomi singoli sono assenti o presenti in eccesso, il numero dei cromosomi non è un multiplo esatto del numero basale. Si distingue, quindi, uno stato ipodiploide, in cui si ha la perdita di uno o più cromosomi, ed uno stato iperdiploide, in cui si ha, invece, l'acquisto di uno o più cromosomi. Monosomia: perdita di un singolo cromosoma ($2n - 1$); trisomia: acquisto di un cromosoma ($2n + 1$).
Centromero	costrizione dei cromosomi (detta <i>primaria</i>) separante il braccio corto (p) dal braccio lungo (q), con al centro un granulo detto cinetocore su cui si legano le fibre del fuso, addette alla trazione dei cromosomi nel corso della mitosi.
Cinetocore	porzione centrale del centromero su cui si legano le fibre del fuso
Euploidia	complemento (quantità di DNA presente in un genoma aploide) di cellule somatiche che sia un multiplo esatto del numero basale della specie. Si distinguono così un complemento monoploide o aploide (23 cromosomi), diploide (46 cromosomi), triploide (69 cromosomi), tetraploide, etc.
Clastogeno	Agente chimico o fisico in grado di indurre rotture cromatidiche o cromosomiche.

Delezione	distacco e successiva perdita di un intero braccio cromosomico o di una sua porzione. Le delezioni possono essere terminali, con perdita dell'estremità di un cromosoma, o, più frequentemente, interstiziali, con perdita di un frammento interno. In seguito ad una doppia rottura si può anche avere la formazione di un cromosoma ad anello (ring).
Inversione	se vi sono due rotture in un cromosoma, si forma un frammento che può essere perduto (vedi delezione) o può essere riattaccato dopo aver avuto una rotazione di 180°. Se il frammento comprende il centromero, l'inversione viene detta pericentrica; in caso contrario è detta paracentrica.
Metafase	stadio della mitosi in cui i cromosomi sono meglio evidenziabili perché si allineano all'equatore della cellula con dissoluzione dell'involucro nucleare.
Poliploidia	termine generico per indicare un corredo cromosomico superiore al numero diploide. Si verifica quando alla divisione nucleare non segue una divisione citoplasmatica.
Traslocazione	Esistono vari tipi di traslocazione. La traslocazione <i>semplice</i> si ha quando, in seguito ad una singola rottura, un frammento di cromosoma si fonde con l'estremità terminale di un cromosoma eterologo integro. Tale tipo di traslocazione è piuttosto rara, in quanto l'estremità del cromosoma non è di solito adesiva, per cui la fusione è difficile. Più comune è la traslocazione <i>reciproca</i> che si verifica a seguito di rotture singole di due cromosomi eterologhi che si scambiano i rispettivi frammenti. Nel processo si possono avere talvolta delezioni, ossia perdita di materiale genetico; se ciò non accade, la traslocazione viene detta <i>bilanciata</i> , in quanto viene conservato il normale dosaggio genico ed i soggetti portatori della traslocazione sono del tutto normali. Se i due cromosomi eterologhi si scambiano dei frammenti privi di centromero (frammenti acentrici), la fusione viene detta <i>eucentrica</i> o <i>centrica</i> . A volte invece si può avere la fusione di due frammenti provvisti di centromero, con formazione di un cromosoma <i>dicentrico</i> , e dei due frammenti acentrici con formazione di un grosso frammento acentrico che viene perso con le successive divisioni cellulari. Si parla in tal senso di <i>fusione aneucentrica</i> .

Bibliografia

1. Abend M., Rhein A., Gilbertz K.P., Blakely W.F., Van Beuningen D.: Correlation of micronucleus and apoptosis assays with reproductive cell death. *Int. J. Radiat. Biol.* 1995, VOL: 67(3), P: 315.
2. Aitio A., Becking G., Berlin A., et al.: Indicators for assessing exposure and biological effects of genotoxic chemicals. Consensus and technical reports. EUR 11642 EN. Luxembourg, CEC, 1988.
3. Albertini S.: Aneuploidy assays in routine screening? In Madle S. and Muller L. (Eds), *Current Issue in Genetic Toxicology*, BGA-Schriften, MMV, Medizin-Verlag, Munchen 1993, P: 64.
4. Anwar W.A., Salama S.I., El Serafy M.M., Hemida S.A., Hafez A.S.: Chromosomal aberrations and micronucleus frequency in nurses occupationally exposed to cytotoxic drugs. *Mutagenesis*. 1994, VOL: 9(4), P: 315.
5. Bauchinger M., Schmid E., Zitzelsberger H., Braselmann M., Nahrstedt U.: Radiation-induced chromosome aberrations analysed by two colour fluorescence in-situ hybridization with composite whole chromosome-specific DNA probes and a pancentromeric DNA probe. *Int. J. Radiat. Biol.* 1993, VOL: 64, P: 179.
6. Böcker W., Streffer C., Müller W.U., Yu C.: Automated scoring of micronuclei in binucleated human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 1996, VOL: 70, P: 529.
7. Böcker W., Müller W.U., Streffer C.: Image processing algorithms for the automated micronucleus assay in binucleated human lymphocytes. *Cytometry* 1995 Apr, VOL: 19(4), P: 283.
8. Bonassi S., Abbondandolo A., Camurri L., Dal Pra L., De Ferrari M., Degrossi A., Forni A., Lamberti L., Lando C., Padovani P., et al.: Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1995, VOL: 79, P: 133.
9. Carter S.B.: Effects of cytochalasins on mammalian cells. *Nature* 1967, VOL: 213, P: 261.
10. Castelain Ph., Van Hummelen P., Deleener A., Kirsch-Volders M.: Automated detection of cytochalasin-B blocked binucleated lymphocytes for scoring micronuclei. *Mutagenesis* 1993, VOL: 4, P: 285.
11. Catalan J., Autio K., Wessman M., Lindholm C., Knuttila S., Sorsa M., Norppa H.: Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women. *Cytogenet. Cell. Genet.* 1995, VOL: 68, P: 11.

12. Catena C., Parasacchi P., Conti D., Righi E., Marengo P., Bortolato B., Botturi M., Leoni M., Portalupi M., Palaeani-Vettori P.G.: Predittività dei metodi citogenetici nella risposta alla radioterapia. *Radiol. Medica* 1995, VOL: 90(1), P: 255.
13. Catena C., Villani P., Conti D., Righi E.: Micronuclei and 3AB index in X-irradiated human lymphocytes in G₀ and G₁ phases. *Mutat. Res.* 1994 Dec 1, VOL: 311(2), P: 231.
14. Countryman J.I., Heddle J.A.: The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Res.* 1976, VOL: 41, P: 321.
15. Crebelli R., Carere A.: Aneuploidy assays in routine screening?, in: Madle S. and Muller L. (Eds), *Current Issues in Genetic Toxicology*, BGA-Schriften 1/93, MMV Medizin-Verlag Munchen, P: 70.
16. Degrassi F., Tanzarella C.: Immunofluorescent staining of kinetichores in micronuclei: a new assay for detection of aneuploidy. *Mutation Res.* 1988, VOL: 203, P: 339.
17. Deleener A., Gunst J., Vanderkerken K., Kirsch-Volders M.: Quantitative image analysis and flow cytometry can improve early detection of Cancer. Proceeding of the second international symposium, in: Eylenbosch W.J., Kirsch-Volders M., Weyler J. and Deleener (Eds), *Primary prevention and Cancer*, Springer, 1991, VOL: 122, P: 42.
18. Eastmond D.A.: Induction of micronuclei and aneuploidy by the quinone-forming agents benzene and *o*-phenylphenol. *Toxicol Lett. (Amst.)* 1993, VOL: 67, P: 465.
19. Eastmond D.A., Pinkel D.: Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in situ* hybridization with chromosome-specific DNA probes. *Mutation Res.* 1990, VOL: 234, P: 9.
20. Eastmond D.A., Rupa D.S., Hasegawa L.S.: Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes. *Mutation Res.* 1994, VOL: 322, P: 9.
21. Eastmond D.A., Tucker J.D.: Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an anti-kinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen.* 1989, VOL: 13, P: 34.
22. Elhajouji A., Van Hummelen P., Kirsch Volders M.: Indications for a threshold of chemically-induced aneuploidy *in vitro* in human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 1995, VOL: 26(4), P: 292.

23. Falkvoll K.H.: The occurrence of apoptosis, abnormal mitoses, cells dying in mitosis and micronuclei in a human melanoma xenograft exposed to single dose irradiation. *Strahlentherapie und Onkologie* 1990, VOL: 166, P: 487.
24. Farooqi Z., Darroudi F., Natarajan A.T.: The use of fluorescence *in situ* hybridisation for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis* 1993, VOL: 8, P: 329.
25. Fenech M.: Optimisation of micronucleus assay for biological dosimetry, in: B.L. Gledhill, F. Mauro (Eds), *New Horizons in Biological Dosimetry*, Wiley-Liss, 1991, P: 373.
26. Fenech M.: The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Res.* 1997, VOL: 392, P: 11.
27. Fenech M., Morley A.: Solution of the kinetics problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 1985a, VOL: 43, P: 233.
28. Fenech M., Morley A.: The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutation Res.* 1985; VOL: 148, P: 99.
29. Fenech M., Morley A.: Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Res.* 1985, VOL: 147, P: 29.
30. Fenech M., Neville S.: Conversion of excision-reparable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Envir. Mol. Mutagen.* 1992, VOL: 19(1), P: 27.
31. Fenech M., Rinaldi J., Surrallés J.: The origin of micronuclei induced by cytosine arabinoside and its synergistic interaction with hydroxyurea in human lymphocytes. *Mutagenesis* 1994, VOL: 9, P: 273.
32. Fenech M., Jarvis L.R., Morley A.A.: Preliminary studies on scoring micronuclei by computerised image analysis. *Mutation Res.* 1988, VOL: 203, P: 33.
33. Forni A.: Comparison of chromosome aberrations and micronuclei in testing genotoxicity in humans. *Toxicol. Letters* 1994, VOL: 72, P: 185.
34. Frackowiak S., Labidi B., Hernandez-Verdun D., Bouteille M.: Preservation of chromosome integrity during micronucleation induced by colchicine in Ptk₁ cells. *Chromosoma* 1986, VOL: 84, P: 468.
35. Gatti A.R., Boder E., Vinters H.V., Sparkes R.S., Norman A., Lange K.: Ataxia-telangiectasia: an interdisciplinary approach to pathogenesis. *Medicine* 1991, VOL: 70, P: 99.
36. Gaziev A.I., Sologub G.R., Fomenko L.A., Zaichkina S.I., Kosyakova N.I., Bradbury R.J.: Effect of vitamin-antioxidant micronutrients on the frequency of spontaneous and *in vitro* gamma-ray-induced micronuclei

- in lymphocytes of donors: the age factor. *Carcinogenesis* 1996, VOL: 17 (3), P: 493.
37. Gordon D.J., Milner A.E., Vaughan A.T.M., Chipman J.K.: The use of flow cytometry in the detection of radiation and chemically induced nuclear damage in human mononuclear cells. *Mutagenesis* 1989, VOL: 4, P: 35.
 38. Grawé J., Abramsson-Zetterberg L., Eriksson L., Zetterberg G.: The relationship between DNA content and centromere content in micronucleated mouse bone marrow polychromatic erythrocytes analysed and sorted by flow cytometry. *Mutagenesis* 1994, VOL: 9, P: 31.
 39. Grawé J., Zetterberg G., H.: Flow-cytometric enumeration of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Cytometry* 1992, VOL: 13, P: 750.
 40. Guarente L.: Do changes in chromosomes cause aging? *Cell* 1996, VOL: 86, P: 9.
 41. Guttenbach M., Schmid M.: Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-Azacytidine treatment of lymphocyte cultures. *Exp. Cell Res.* 1994, VOL: 211, P: 127.
 42. Hagmar L., Brogger A., Hansteen IL., Heim S., Hogstedt B., Knudsen L., Lambert B., Mitelman F., Nordenson I., Reuterwall C., Salomaa S., Skerfving S., Sorsa M.: Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.* 1994 Jun, VOL: 54(11), P: 2919.
 43. Hando J.C., Nath J., Tucker J.D.: Sex chromosomes and aging in women. *Chromosoma* 1994, VOL: 103, P:186.
 44. Hayashi M., Norppa H., Sofuni T., Ishidate M.Jr: Mouse bone marrow micronucleus test using flow cytometry. *Mutagenesis.* 1992 Jul, VOL: 7(4), P: 251.
 45. Hayflick L.: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strain. *Exp. Cell Res.* 1995, VOL: 37, P: 614.
 46. Heddle J.A., Benz R.D., Countryman P.I.: Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. In Evans H.J., Lloyd D.C. (Eds.) *Mutagen-induced chromosome damage in man.* University Press, Edinburgh pp. 191-200, 1978.
 47. Hermine T., Nigel J.J., Parry J.M.: Comparative induction of micronuclei in repair-deficient and -proficient Chinese hamster cell lines following clastoge, or aneugens exposures. *Mutation Res.* 1997, VOL: 392, P: 151.
 48. Hong W.K., Lippman S.M., Itri L.M., Karp D.D., Lee J.S., Byers R.M., Schantz S.P., Kramer A.M., Lotan R., Peters L.J., Dimery I.W., Brown B.

- W., Goepfert H.: Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous cell carcinoma of the cell carcinoma of the head and neck. *New. Engl. J. Med.* 1990, VOL: 323, P: 795.
49. Huber R., Salassidis K., Kulka U., Braselman H., Bauchinger M.: Detection of centromeres in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of human lymphocytes with an a satellite pancentromeric DNA probe. *Envir. Mol. Mut.* 1996, VOL:27, P: 105.
 50. Kirsch-Volders M., Tallon I., Tanzarella C., Sgura A., Hermine T., Parry E.M., Parry J.M.: Mitotic non-disjunction as a mechanism for *in vitro* aneuploidy induction by X-rays in primary human cells. *Mutagenesis* (in corso di stampa).
 51. Lin C.D., Lin S.: Actin polimeration induced by a motility-related high-affinity cythocalasin binding complex from human erythrocyte membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, VOL: 76(5), P: 23455.
 52. Linholm C., Norrpa H., Hayashi M., Sorsa M.: Induction of micronuclei and anaphase aberation by cytochalasin-B in human lymphocytes cultures. *Mutation Res.* 1991, VOL: 260, P: 369.
 53. Machado-Santelli G.M., Cerqueira E.M., Oliveira C.T., Pereira C.A.: Biomonitoring of nurses handling antineoplastic drugs. *Mutation Res.* 1994 Sep, VOL: 322(3), P: 203.
 54. Meyn R.E., Stephens L.C., Kian Ang K., Hunter N.R., Brock W.A., Milas L., Peters L.J.: Heterogeinity in the development of apoptosis in irradiated murine tumours of different histologies. *Int. J. Radiat. Biol.* 1993, VOL: 64, P: 583.
 55. Miller B.M., N(sse M.: Analysis of micronuclei induced by 2-chlorobenzylidene malonitrile (CS) using fluorescence *in situ* hybridization with telomeric and centromeric DNA probes and flow cytometry. *Mutagenesis* 1993, VOL: 8, P: 35.
 56. Miller B.M., Zitzelsberger H. F., Weier H. U.G., Adler I. D.: Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescence staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellilte DNA. *Mutagenesis* 1991, VOL: 6, P: 297.
 57. Miller B.M., Werner T., Weier H.U., N(sse M.: Analysis of radiation-induced micronuclei by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) simultaneously using telomeric and centromeric DNA probes. *Radiat. Res.* 1992, VOL: 131, P: 177.
 58. Norman A., Cameron Mitchell J., Iwamoto K.S.: A sensitive assay for 6-thioguanine- resistant lymphocytes. *Mutation Res.* 1988, VOL: 208, P: 17.
 59. Nusse M., Marx K.: Flow cytometric analysis of micronuclei in cell

- cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages. *Mutation Res.* 1997, VOL: 392, P: 109.
60. Nusse M., Kramer J., Miller B.M.: Factors influencing the DNA content of radiation-induced micronuclei. *Int. J. Radiat. Biol.* 1992, VOL: 62, P: 587.
 61. Nusse M., Miller B.M., Grawé J.: Analysis of the DNA content distribution of micronuclei using flow sorting and FISH with a centromeric DNA probe. *Mutagenesis* 1996, VOL: 11, P: 405.
 62. Oestreicher U., Stephan G., Glatzel M.: Chromosome and SCE analysis in peripheral lymphocytes of persons occupationally exposed to cytostatic drugs handled with and without use of safety covers. *Mutat. Res.* 1990, VOL: 242, P: 271.
 63. Parry J.M., Feilder R.J., McDonald A.: Threshold for aneuploidy-inducing chemicals. *Mutagenesis* 1994, VOL: 9, P: 503.
 64. Pincu M., Callisen H., Norman A.: DNA content of micronuclei in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 1985, VOL: 74, P: 423.
 65. Pohlova H., Cerna M., Rossner P.: Chromosomal aberrations, SCE and urine mutagenicity in workers occupationally exposed to cytostatic drug. *Mutat. Res.* 1986, VOL: 174, P: 213.
 66. Prosser J.S., Moquet J.E., Lloyd D.C., Edwards A.A.: Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutation Res.* 1988, VOL: 199, P: 37.
 67. Rieger R., Michaelis A., Green M.M.: *A Glossary of Genetics and Cytogenetics*, 3rd Ed., 1968 Allen and Unwin, London, pp. 507.
 68. Roth S., Norppa H., Jarventaus H., Kyyronen P., Ahonen M., Lehtomaki J., Sainio H., Sorsa M.: Analysis of chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and micronuclei in peripheral lymphocytes of pharmacists before and after working with cytostatic drugs. *Mutat. Res.* 1994, VOL: 325(4): 157.
 69. Sarto F., Finotto S., Giacomelli L., Mazzotti R., Tomanin R., Levis A. G.: The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis* 1987, VOL: 2, P: 11.
 70. Schmid W.: Chemical mutagen testing on in vivo somatic cells. *Agent Actions* 1973, VOL: 3, P: 77.
 71. Schneider B.M., Wurgler F.E., Romagna F.: Distinct area distribution differences of micronuclei induced by clastogenic and aneuploidogenic chemical in the bone marrow of the CD-1 mouse. *Mutation Res.* 1995, VOL: 334, P: 81.
 72. Schreiber G.A., Beisker W., Bauchinger M., Bogl K.W., Nusse M.:

- Technical report: an automated flow cytometric micronucleus assay for human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 1992b, VOL: 62, P: 695.
73. Schreiber G.A., Beisker W., Bauchinger M., Nüsse M., Multiparametric flow cytometry analysis of radiation-induced micronuclei in mammalian cell cultures. *Cytometry* 1992, VOL: 13, P: 90.
 74. Sessink P.J.M., Cerna M., Rossner P., Pastorkova A., Bavarova H., Frankova K., Anzion R.B., Bos R.P.: Urinary cyclophosphamide excretion and chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes after occupational exposure to antineoplastic agents. *Mutat. Res.* 1994, VOL: 309, P: 193.
 75. Slavotinek A., Sauer-Nehls S., Braselmann H., Taylor G.M., Nüsse M.: Chromosome painting of radiation-induced micronuclei. *Int. J. Radiat. Biol.* 1996, VOL: 70, P: 393.
 76. Sorsa M., Pyy L., Salomaa S., Yager J.W.: Biological and environmental monitoring of occupational exposure to cyclophosphamide in industry and hospitals. *Mutation Res.* 1988, VOL: 204, P: 465.
 77. Stephens L.C., Kian Ang K., Schultheiss T.E., Milas L., Meyn R.E.: Apoptosis in irradiated murine tumors. *Radiation Res.* 1991, VOL: 127, P: 308.
 78. Stich H.F., Curtis J.R., Parida B.B.: Application of the micronucleus test to exfoliated cells of a high cancer risk group: tobacco chewers. *Int. J. Cancer* 1982, VOL: 30, P: 553.
 79. Strauss G.H., Albertini R.J.: Enumeration of 6-thioguanine resistant peripheral blood lymphocytes in man as a potential test for somatic cell mutation arising in vivo. *Mutation Res.* 1979, VOL: 61, P: 353.
 80. Surrallés J., Carbonell E., Marcos R., Degraffi F., Antoccia A., Tanzarella C.: A collaborative study on the improvement of the micronucleus test in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 1992, VOL: 7(6), P: 407.
 81. Surrallés J., Natarajan A.T.: Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutation Research* 1997, VOL: 392, P: 165.
 82. Tates A.D., Van Welie M.T., Ploem J.S.: The present state of the automated micronucleus test for lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 1990, VOL: 58, P: 813.
 83. Thiringer G., Granung G., Holmen A., Hogstedt B., Jarvholm B., Persson L., Wahlstrom, Westin J.: Comparison of methods for the bio-monitoring of nurses handling antitumor drugs. *Scand. J. Work Environ. Health* 1991, VOL: 117, P: 133.
 84. Thompson E., Perry P.: The identification of micronucleated chromo-

- somes: a possible assay for aneuploidy. *Mutagenesis* 1988, VOL: 3, P: 415.
85. Tometsko A.M., Torous D.K., Dertinger S.D.: Analysis of micronucleated cells by flow cytometry. I. Achieving high resolution with a malaria model. *Mutation Res.* 1993, VOL: 292, P: 129.
 86. Torbert P.E., Shi C. M., Allen J.W.: Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutation Res.* 1992, VOL: 271, P: 69.
 87. Van Hummelen P., Deleener A., Vanparys Ph., Kirsch-Volders M.: Discrimination of aneuploidogens from clastogens by C-banding, DNA and area measurements of micronuclei from mouse bone marrows. *Mutation Res.* 1992, VOL: 271, P: 13.
 88. Van Hummelen P., Elhajouji A., Kirsch-Volders M.: Clastogenic and aneugenic effect of threebenzimidazole derivatives in the in vitro test using human lymphocytes. *Mutagenesis* 1995a, VOL: 10, P: 23.
 89. Van Hummelen P., Nusse M., Castelain Ph., Kirsch-Volders M.: Aneugen induced micronuclei (MN), in human lymphocytes may be discerned using image analysis techniques when cell cycle stage is taken into account. *Environ. Mol. Mutagen.* 1995b, VOL: 25, P: 269.
 90. Vanderkerken K., Vanparijs Ph., Verschaeve L., Kirsch-Volders M.: The mouse bone marrow micronucleus assay can be used to distinguish aneugens from clastogens. *Mutagenesis* 1989, VOL: 4, P: 6.
 91. Vanparijs Ph., Vermeiren F., Sysmans M., Temmerman R.: The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutation Res.* 1990, VOL: 244, P: 95.
 92. Verhaegen F., Vral A., Seuntjens J., Schipper NW., de Ridder L., Thierens H.: Scoring of radiation-induced micronuclei in cytokinesis-blocked human lymphocytes by automated image analysis. *Cytometry* 1994 Oct, VOL: 17(2), P: 119.
 93. Viaggi S., Braselman H., Nusse M.: Flow cytometric analysis of micronuclei in the CD2⁺ subpopulation of human lymphocytes enriched by magnetic separation. *Int; J. Radiat. Biol.* 1995, VOL: 67, P: 193.
 94. Wakata A., Sasaki M.S.: Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations. *Mutation Res.* 1987, VOL: 190, P: 51.
 95. Weier H.U., Lucas J., Poggensee M., Segraven R., Pinkel D., Gray J.W.: Two-colour hybridisation with high complexity chromosome-specific probes and a degenerate alpha satellite probe DNA allows unambiguous discrimination between symmetrical and asymmetrical translocations. *Chromosoma* 1991, VOL: 100, P: 311

96. Weirich-Schwaiger H., Weirich H.G., Gruber B., Schweiger M., Hirsch-Kauffmann M.: Correlation between senescence and DNA repair in cells from young and old individuals and in premature aging syndromes. *Mutat. Res.* 1994, VOL: 316(1), P: 37.
97. Yager J.W., Sorsa M., Selvin S.: Micronuclei in cytokinesis-blocked lymphocytes as an index of occupational exposure to alkylating cytostatic drugs. *IARC Sci. Publ.* 1988, VOL: 89, P: 213.
98. Zijno A., Marcon F., Leopardi P., Crebelli R.: Simultaneous detection of X-chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked human lymphocytes by *in situ* hybridization with a centromeric DNA probe; implications for the human lymphocytes in vitro micronucleus assay using cytochalasin B. *Mutagenesis* 1994, VOL: 9, P: 225.

Indice

Editoriale	pag. 3
Introduzione	» 5
Indicatori citogenetici di genotossicità	» 6
Le aberrazioni cromosomiche	» 6
L'interscambio di DNA tra cromatidi fratelli	» 8
I micronuclei	» 8
Definizione di micronucleo	» 10
Il test CBMN o test dei micronuclei con il blocco della citodieresi ..	» 11
Il linfocita quale dosimetro biologico	» 13
Danno genetico e ciclo cellulare	» 13
Problemi inerenti l'uso della citocalasina B	» 14
L'NDI o indice di divisione nucleare	» 15
Osservazione di ponti nucleoplasmatici	» 18
Eventi di escissione e riparo	» 19
Individuazione delle varianti linfocitarie HPRT	» 20
Valutazione di cellule apoptotiche	» 21
Eventi di mal-segregazione	» 22
Il test immunocitochimico "CREST"	» 23
L'esame FISH (Fluorescenza <i>in situ</i> hybridization)	» 24
Il bandeggio C	» 27
Il test CBMN come strumento biodosimetrico	» 31
Valore predittivo della positività degli indicatori citogenetici	» 33
Personale professionalmente esposto	» 33
Valutazione della frequenza di micronuclei nell'anziano	» 35
Conclusioni e prospettive	» 38
Glossario	» 40
Bibliografia	» 42
Indice	» 51

Caleidoscopio

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 del - l'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 -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 e 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., Gnassi 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 oppor - tunistiche 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 Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *In - fezione-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.: *Iperensione 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 radio - nuclidi 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 Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodel - lamento 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.: *Im - munoflogosi 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 prin - cipi 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 sperimentazione 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*. Giu - gno '96.
104. Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.
105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: *Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tis - sutale 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.
107. Morganti R.: *Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali.* Dicembre '96.
108. Andreoni S.: *Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti.* Gennaio '97.
109. Salemi A., Zoni R.: *Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi.* Febbraio '97.
110. Meisner M.: *Procalcitonina.* Marzo '97.
111. Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: *Malattie a trasmissione sessuale (2).* Aprile '97.
112. Palleschi G. Moscone D., Compagnone D.: *Biosensori elettrochimici in Biomedicina.* Maggio '97.
113. Valtriani C., Hurle C.: *Citofluorimetria a flusso.* Giugno '97.
114. Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.: *Alcol e problemi correlati.* Settembre '97.
115. Piccinelli M.: *Depressione Maggiore Unipolare.* Ottobre '97.
116. Pepe M., Di Gregorio A.: *Le Tiroiditi.* Novembre '97.
117. Cairo G.: *La Ferritina.* Dicembre '97.
118. Bartoli E.: *Le glomerulonefriti acute.* Gennaio '98.
119. Bufi C., Tracanna M.: *Computerizzazione della gara di Laboratorio.* Febbraio '98.
120. National Academy of Clinical Biochemistry: *Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide.* Marzo '98.
121. Fava G., Rafanelli C., Savron G.: *L'ansia.* Aprile '98.
122. Cinco M.: *La Borreliosi di Lyme.* Maggio '98.
123. Giudice G.C.: *Agopuntura Cinese.* Giugno '98.
124. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (I).* Luglio '98.
125. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Basofili.* Settembre '98.
126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: *Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo I.* Novembre '98.
127. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (II).* Dicembre '98.
128. Muzi P., Bologna M.: *Tecniche di immunoistochimica.* Gennaio '99.
129. Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: *Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali.* Febbraio '99.
130. Castello G., Silvestri I.: *Il linfocita quale dosimetro biologico.* Marzo '99.

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 17, numero 130

Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464
Tel. mobile 0338 2202502
E-mail: rassu@ssnet.it

Responsabile Ufficio Acquisti

Giusi Cunietti

EDITORE



Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione

Letizia Cuccuru

Servizio Abbonamenti

Maria Grazia Papalia
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://medicalsistemas.editoria.com> e <http://www.medicalsistemas.it>
La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Journal of Clinical Ligand Assay,
Guida Pratica Immulite[®], Caleidoscopio, Kaleidoscope, Caleidoscopio letterario, Pandora,
Journal of Preventive Medicine and Hygiene, Tribuna Biologica e Medica.

Stampa

Tipolitografia ATA
16143 Genova - Via G. Torti, 32 c.r.
Tel. (010) 513120 - Fax (010) 503320

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: Marzo 1999
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