

RUOLO DEI SAGGI DI ECO-GENOTOSSICITÀ PER LA PROTEZIONE DELL'AMBIENTE E DELLA SALUTE UMANA

Roberta Meschini (a), Silvia Filippi (a), Sara Spognardi (b), Patrizia Papetti (c), Dario Angeletti (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche, Università della Tuscia, Viterbo*

(b) *Dipartimento di Economia Aziendale, Università di Roma Tre, Roma*

(c) *Dipartimento di Economia e Giurisprudenza, Università di Cassino e del Lazio meridionale, Cassino*

L'eco-genotossicologia è stata definita da Shugart e Theodorakis (1994) come lo studio delle interazioni tra il materiale genetico e gli agenti di origine antropica che lo danneggiano, in relazione ai successivi effetti sulla salute degli organismi. Gli studi di ecotossicologia non possono quindi prescindere da quelli di genotossicologia. Quest'ultima studia gli effetti genotossici mediante l'uso di biomarcatori che identificano l'induzione di danno al DNA. I biomarcatori, a loro volta, costituiscono degli specifici parametri di misurazione che permettono di quantificare l'esposizione e le conseguenze in termini di effetti genetici. Inoltre, tra i biomarcatori possiamo distinguere quelli di esposizione, cioè una sostanza esogena rilevata in un compartimento dell'organismo che identifica e quantifica l'esposizione a genotossici, e quelli di effetto che rappresentano la conseguenza dell'esposizione, possono spaziare da alterazioni a livello di un bersaglio critico a cambiamenti tardivi progressivi e valutano la risposta biologica (Migliore, 2004). Il *Comet Assay* e il saggio del micronucleo (MN test) rappresentano i più rilevanti biomarcatori di effetto. Il primo quantifica il danno primario al DNA, in termini di rotture a singola e doppia elica, e la sua cinetica di riparazione. Tra i principali vantaggi del *Comet Assay* ricordiamo la sua facilità di allestimento, la rapidità di esecuzione, le ridotte quantità di substrato, l'applicazione ad ogni tipo di cellula *in vitro* e *in vivo*, l'elevata sensibilità, e la sua correlazione con altri test di genotossicità (Grandi *et al.*, 2006). Il secondo, invece, valuta il processamento del danno primario al DNA in danno cromosomico espresso in termini di micronuclei. Questi ultimi rappresentano dei piccoli nuclei addizionali che si formano dalla condensazione di frammenti cromosomici o da interi cromosomi che, restando indietro durante il movimento dei cromosomi all'anafase, non sono incorporati nei nuclei principali delle cellule figlie e che originano quindi, rispettivamente, dalla frammentazione dei cromosomi ad opera di agenti clastogeni o dal danneggiamento del fuso mitotico o del centromero di cromosomi interi da parte di agenti aneuploizzanti (Fenech *et al.*, 2016). I principali obiettivi dell'eco-genotossicologia sono quelli di valutare l'effetto degli xenobiotici su organismi di popolazioni naturali come anche di individuare segnali precoci di contaminazione, prima che questa abbia degli effetti sugli ecosistemi e sulla salute umana; in questo caso la ricerca è indirizzata spesso ad individuare e testare potenziali "organismi sentinella" e a standardizzare i protocolli sperimentali (Beeby, 2001; Sebbio *et al.*, 2014). Gli organismi sentinella costituiscono degli organismi, sia animali sia vegetali, in grado di indicare il livello di contaminazione di uno specifico ambiente quale suolo, acqua o aria. A tale scopo, un organismo sentinella dovrebbe essere sensibile, affidabile e consentire l'uso di una metodologia relativamente economica, trasferibile e adeguata. Gli organismi sentinella, quindi, devono avere caratteristiche tali da poter fornire delle misure sensibili ed ecologicamente rilevanti della risposta che può essere indotta dalle variazioni dell'ambiente (Bolognesi & Venier 2004). Inoltre, tali organismi devono poter manifestare delle risposte precoci ai contaminanti ambientali, prima che questi ultimi esercitino i loro effetti sull'ecosistema e sull'essere umano (Bonisoli-Alquati, 2014).

I gasteropodi terrestri del genere *Helix* sono organismi facili da reperire in natura o possono essere acquistati presso aziende agricole. Inoltre, grazie al loro tipo di habitat, la loro scarsa mobilità e il loro comportamento alimentare possono fornire informazioni importanti sulla qualità dell'ambiente. Infatti, il contatto con un agente inquinante può verificarsi attraverso l'ingestione del suolo e della vegetazione, il contatto con il suolo e l'inalazione dell'aria (Sebbio *et al.*, 2014). I gasteropodi terrestri del genere *Helix*, inoltre, hanno la capacità di accumulare diverse classi di sostanze chimiche motivo per cui sono dei potenziali organismi sentinella e una specie idonea per il biomonitoraggio ambientale di metalli, sostanze chimiche inquinanti, inquinamento urbano ed esposizione elettromagnetica (Berger, 1993; Gomot de Vaufléury & Pihan, 2000; Beeby & Richmond, 2003; Viard *et al.*, 2004; Regoli *et al.*, 2006). In questo studio abbiamo utilizzato la comune chiocciola di terra *Helix aspersa*, per rilevare l'effetto mutageno dell'inquinamento causato da una centrale a carbone applicando l'MN test sugli emociti della chiocciola e valutando la concentrazione di elementi in traccia, come arsenico (As), cadmio (Cd), piombo (Pb), mercurio (Hg) e zinco (Zn), nel terreno e nelle chioccioline. In particolare, è stata presa in considerazione la Centrale di "Torvaldaliga Nord" è situata in prossimità della città di Civitavecchia (RM), in Italia centrale. Il carbone è considerato il combustibile più inquinante a livello ambientale (Celik *et al.*, 2007; Northrup, 2013; Rohr *et al.*, 2013). La sua estrazione e combustione causano, infatti, un significativo effetto ambientale sull'aria, sul suolo e sulle risorse idriche nelle aree adiacenti alle Centrali a carbone. I rifiuti di carbone e la combustione del carbone producono Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e altri composti organici e inorganici (León *et al.*, 2007; Depoi *et al.*, 2008) con potenziali effetti ecotossici, genotossici e cancerogeni sull'uomo e sul biota che determinano un esito rilevante sugli ecosistemi (Finkelman, 1995; Liu *et al.*, 1999; Swaine, 2000; Zhang *et al.*, 2008). In particolare, nel presente studio, chioccioline provenienti da un'azienda agricola biologica sono state esposte per 13 giorni in cinque località situate a diverse distanze dalla centrale a carbone "Torvaldaliga Nord" (Tabella 1) con il fine di comparare la frequenza dei micronuclei negli emociti nelle cinque località rispetto al controllo come anche per verificare se vi fosse una maggiore frequenza di micronuclei nelle chioccioline esposte nelle località più vicine alla centrale.

Tabella 1. Principali caratteristiche della località di controllo (A) e delle località di esposizione e campionamento di *H. aspersa* (posizioni B-F). Vengono inoltre riportate le rispettive distanze dal camino della centrale

Località	Principali caratteristiche	Distanza dal camino in km
A	Zona collinare (380 m sopra il livello del mare) di agricoltura non intensiva a 4,1 km dall'area urbana più vicina e attraversata da strade sterrate locali	36,71
B	Zona collinare (120 m sopra il livello del mare) di agricoltura non intensiva a 6,2 km dall'area urbana più vicina e attraversata da strade sterrate locali	20,10
C	Zona pianeggiante e semi-naturale vicino al mare (3 m sopra il livello del mare) all'interno della Riserva Naturale "Saline di Tarquinia" a 2,5 km dall'area urbana più vicina e attraversata da una strada pedonale. La Riserva naturale protegge una laguna costiera semi-naturale per la produzione di sale, dismessa nel 1997, in cui non sono consentite attività umane e il transito di automobili	8,87
D	Pineta semi-naturale in zona pianeggiante a due passi dal mare (2 m sopra il livello del mare) a 6,0 km dall'area urbana più vicina (Civitavecchia) e attraversata da una strada sterrata locale	2,72
E	Zona pianeggiante e semi-naturale di agricoltura non intensiva (50 m sopra il livello del mare) a 4,0 km dall'area urbana più vicina (Civitavecchia) e attraversata da strade locali	1,48
F	Area di campi a maggese vicino al mare (5 m sopra il livello del mare), situata tra la centrale a carbone e una zona residenziale periferica a 1,6 km dall'area urbana più vicina (Civitavecchia) e attraversata da strade locali	1,24

Parallelamente, sono state analizzate anche chioccioline selvatiche raccolte nelle medesime località al fine di comparare la frequenza dei micronuclei tra le chioccioline esposte e quelle selvatiche e di verificare se vi fosse anche nelle chioccioline selvatiche una maggiore frequenza di micronuclei nelle località più vicine alla centrale. Infine, sono state analizzate le concentrazioni degli elementi in traccia quali As, Cd, Pb, Hg e Zn che possono derivare dalla combustione del carbone, nel terreno e nei tessuti delle chioccioline sia esposte che selvatiche per verificare la possibile correlazione con la frequenza dei micronuclei. Le cinque località, le cui principali caratteristiche sono descritte nella Tabella 1, sono state selezionate per i seguenti motivi:

- replicare le stesse località considerate nello studio precedente (Angeletti *et al.*, 2013) dove era emersa una correlazione inversa tra la percentuale di DNA nella coda della cometa, parametro assunto quale indice di danno al DNA, e la distanza dalla centrale, suggerendo che il danno primario al DNA diminuiva in funzione dell'aumento della distanza dalla fonte di inquinamento;
- sono luoghi apparentemente non interessati dalla contaminazione proveniente da altre potenziali fonti di inquinamento;
- sono località posizionate sottovento rispetto al camino della centrale e ai venti prevalenti che soffiano nella zona.

I risultati del presente studio relativi alla frequenza dei micronuclei rilevati nelle chioccioline esposte e selvatiche sono illustrati nella Figura 1 nella quale lettere diverse indicano invece differenze significative nelle frequenze dei MN (lettere maiuscole per il confronto tra chioccioline esposte e lettere minuscole per il confronto tra chioccioline selvatiche). Gli asterischi sopra le barre indicano differenze significative tra le chioccioline esposte e quelle selvatiche in ogni località.

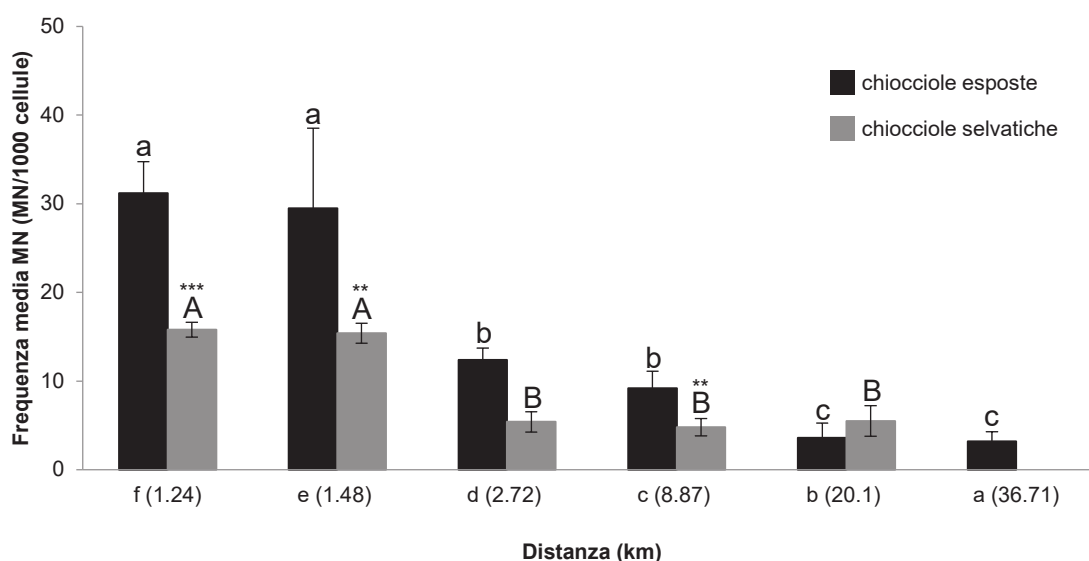


Figura 1. Frequenze medie dei MN nelle chioccioline esposte e selvatiche in funzione della distanza delle sei località (a - f) dal camino della centrale.

Dalla Figura 1 si evince come la frequenza dei MN rilevati nelle chioccioline esposte fosse significativamente più elevata in quattro località situate entro 10 km dalla centrale rispetto al controllo e alle località più lontane. Inoltre, dal confronto tra la frequenza dei MN riscontrata nelle chioccioline allevate ed esposte e quelle selvatiche, è emersa, in tutte le località tranne la più

lontana, una frequenza significativamente più alta nelle prime, indicando un possibile adattamento o selezione degli organismi selvatici a causa dell'esposizione cronica a sostanze inquinanti. Infine, anche nelle chioccioline selvatiche sono state riscontrate frequenze dei MN significativamente più elevate nelle località situate vicino alla centrale.

L'analisi degli elementi in tracce ha rilevato correlazioni significative tra le frequenze dei MN e le concentrazioni di Zn e As nel suolo, sia per le chioccioline esposte che per quelle selvatiche; inoltre, le frequenze dei MN correlavano significativamente anche con le concentrazioni di Zn e Pb riscontrate nel tessuto delle chioccioline esposte.

I risultati del presente studio dimostrano:

- di essere coerenti con quelli precedentemente ottenuti (Angeletti *et al.*, 2013) nella valutazione del danno primario al DNA mediante il *Comet Assay* effettuato in chioccioline selvatiche provenienti dalla stessa area;
- che le chioccioline sia esposte sia selvatiche residenti vicino alla centrale a carbone presentano un danno citogenetico permanente, espresso in termini di micronuclei;
- l'idoneità delle chioccioline come organismi sentinella adatti al biomonitoraggio di inquinanti ambientali con effetto mutageno.

Concludendo, dati i risultati ottenuti nel nostro organismo sentinella *Helix aspersa* e nei precedenti studi epidemiologici, che indicano come l'area di Civitavecchia fosse già colpita da un'alta incidenza di tumore polmonare e pleurico negli adulti e di disturbi respiratori nei bambini residenti, è consigliabile porre in atto tutte le possibili azioni per ridurre l'inquinamento e il rischio ecologico in quest'area. Inoltre, sia il saggio del micronucleo che quello del *Comet Assay* sono metodi sensibili e affidabili per rilevare l'esposizione a composti con potenziali effetti ecotossici, genotossici e cancerogeni sia sull'uomo sia sul biota.

Bibliografia

- Angeletti D, Sebbio C, Carere C, Cimmaruta R, Nascetti G, Pepe G, Mosesso P. 2013. Terrestrial gastropods (*Helix* spp) as sentinels of primary DNA damage for biomonitoring purposes: a validation study. *Environ Mol Mutagen* 2013;54:204-212.
- Beeby A. What do sentinels stand for? *Environ Pollut* 2001;112:285-98.
- Beeby A, Richmond L. Do the soft tissues of *Helix aspersa* serve as a quantitative sentinel of predicted free lead concentrations in soil? *Appl Soil Ecol* 2003;22:159-65.
- Berger B, Dallinger R. Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. *Environ Moni Assess* 1993;25:65-84.
- Bolognesi C, Buschini A, Venier P. Inquinanti genotossici nell'acqua. In: Migliore L (Ed.). *Mutagenesi ambientale*. Bologna: Zanichelli; 2004. p. 280-95
- Bonisolì-Alquati A. Avian genetic ecotoxicology: DNA of the Canary in a coalmine. *Curr Zool* 2014;60:285-98.
- Celik M, Donbak L, Unal F, Yuzbasioglu D, Aksoy H, Yilmaz S, 2007. Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. *Mutat Res* 2007;627:158-63.
- Depoi F, Pozebon D, Kalkreuth W. Chemical characterization of feed coals and combustion-by-products from Brazilian power plants. *Int J Coal Geol* 2008;76:227-36.
- Fenech M, Knasmueller S, Bolognesi C, Bonassi S, Holland N, Migliore L, Palitti F, Natarajan AT, Kirsch-Volders M. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutat Res* 2016;770:12-25.

- Finkelman RB. Modes of occurrence of environmentally sensitive trace elements in coal. In: Swaine DJ, Goodarzi F (Ed.). *Environmental aspects of trace elements in coal*. Kluwer: Dordrecht; 1995. p. 24-50.
- Gomot de Vaufléury A, Pihan F. Growing snails as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere* 2000;40:275-84.
- Grandi C, D'Ovidio MC, Tomao P. Impiego del comet test in medicina del lavoro e tossicologia industriale: considerazioni e prospettive. *G Ital Med Lav Erg* 2006;28(1):5-13.
- León G, Perez IE, Linares JC, Hartmann A, Quintana M, 2007. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. *Mutat Res* 2007;630:42-49.
- Liu GJ, Wang GL, Zhang W. *Study on environmental geochemistry of trace and minor elements in coal*. Jiangsu: University of Mining and Technology Press; 1999.
- Migliore L(Ed.). *Mutagenesi ambientale*. Bologna: Zanichelli; 2004.
- Northrup J, Wittemyer G. Characterising the impacts of emerging energy development on wildlife, with an eye towards mitigation. *Ecol Lett* 2013;16:112-25.
- Regoli F, Gorbi S, Fattorini D, Tedesco S, Notti A, Macchella M, Bocchetti R, Benedetti M, Piva F. Use of the Land Snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. *Environ Health Persp* 2006;114:63-69.
- Sebbio C, Carere C, Nascetti G, Bellisario B, Mosesso P, Cimmaruta R, Angeletti D. Interspecies variation in DNA damage induced by pollution. *Curr Zool* 2014;60:308-14.
- Shugart L, Theodorakis C. Environmental genotoxicity: Probing the underlying mechanisms. *Environ Health Persp* 1994;102(12):13-17.
- Swaine DJ. Why trace elements are important. *Fuel Process Technol* 2000;65-66:21-23.
- Viard B, Pihan F, Promeyrat S, Pihan JC. Integrated assessment of heavy metal (Pb, Zn, Cd) highway pollution: Bioaccumulation in soil, Gramineae and land snails. *Chemosphere* 2004;55:1349-59.
- Zhang Y, Schauer JJ, Zhang Y, Zeng L, Wei Y, Liu Y, Shao M, 2008. Characteristics of particulate carbon emissions from real-world Chinese coal combustion. *Environ Sci Technol* 2008;42:5068-5073.