

Meccanismi di fitotossicità

1. Esposizione e vie di ingresso
2. Assorbimento, distribuzione e metabolismo (*tossicocinetica*)
3. Interazione con il bersaglio: sviluppo di reazioni di difesa (*tossicodinamica*)

1-Esposizione

- Gli inquinanti aerodispersi agiscono all'interno delle foglie
- Una via di ingresso è rappresentata dalle aperture stomatiche
- I depositi di polveri esplicano azione tossica anche senza penetrare nella foglia
- I gas tossici possono essere caustici per le cuticole e le epidermidi



2- Assorbimento, distribuzione e metabolismo

- Gli effetti dannosi possono determinarsi per:
acidificazione,
alcalinizzazione,
azione riducente/ossidante,
sintesi di composti letali,
attività di ormoni,
tossicità su enzimi o strutture molecolari,
induzione di stress osmotici,
aggressione alle membrane

3- sviluppo di reazioni di difesa

- Processi di omeostasi cellulare e di riparazione si possono contrapporre all'azione tossica, secondo equilibri variabili e in funzione di numerosi parametri
- Tali processi sono pianta e inquinante specifici, sono in relazione a parametri ambientali e climatici, alla dose, allo stato fisiologico, al grado di sviluppo della pianta e a molteplici altri aspetti coinvolti

Effetti acuti

- Causati da alte concentrazioni durante esposizioni brevi (meno di 24 h)
 - Lesioni necrotiche fogliari
 - Le lesioni compaiono entro ore o giorni dall'esposizione
 - Possono causare riduzioni di sviluppo e perdite di prodotto

Effetti cronici

- Causati da concentrazioni variabili, generalmente per lunghi periodi
 - Clorosi fogliari, talvolta necrosi
 - La sintomatologia fogliare si manifesta lentamente
 - Possono causare riduzioni di sviluppo e perdite di prodotto

Effetti invisibili

- Causate da concentrazioni basse per periodi variabili
 - Nessun sintomo macroscopico
 - Può essere possibile misurare effetti sui processi fisiologici sulla composizione chimica sulla germinazione del polline e sulla durata del ciclo vegetativo
 - Possono causare riduzioni di sviluppo e perdite di prodotto

Soglie di tossicità

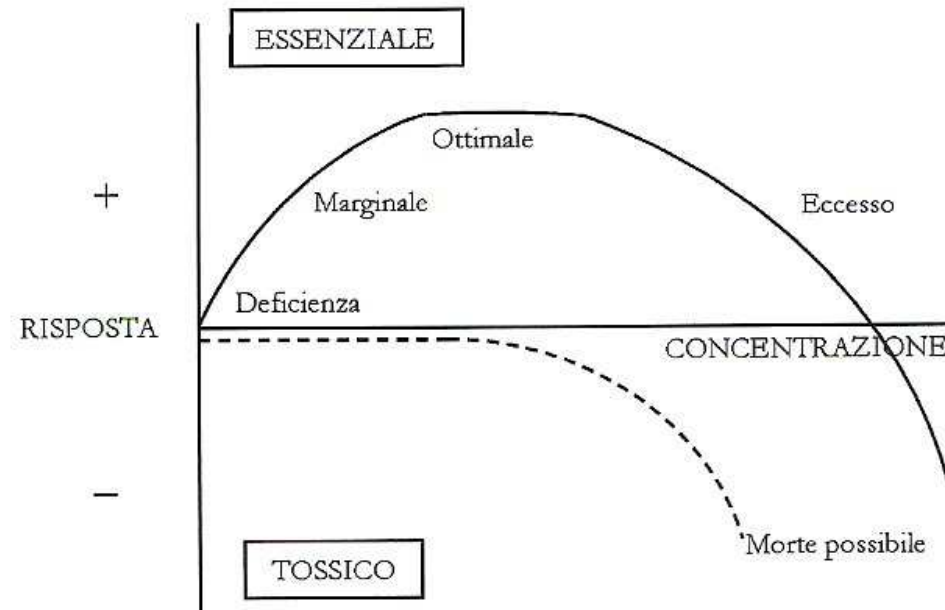
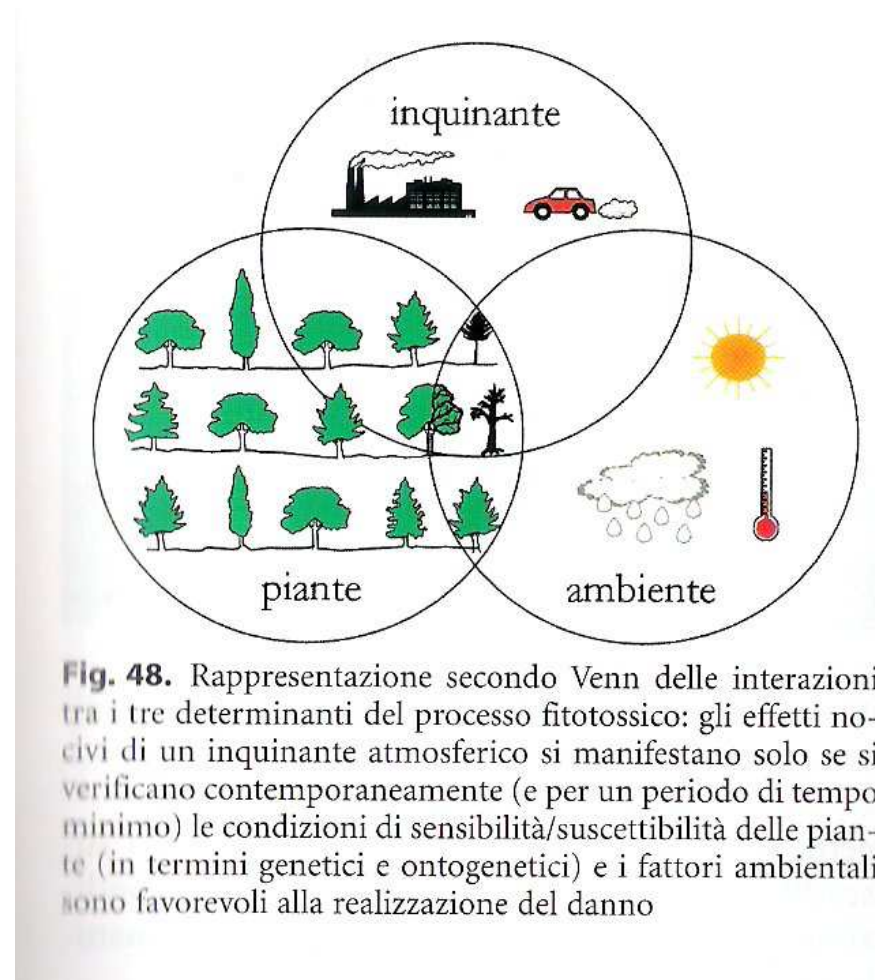


Fig.47. Relazioni tra effetti indotti e concentrazioni di sostanza tossica; *in alto* (curva a tratto continuo) sono presentati gli effetti di un elemento biologicamente essenziale a basse concentrazioni; *in basso* (curva tratteggiata) quelli di uno non essenziale

Fattori influenti sulla risposta agli inquinanti



Bioindicatori - Bioaccumulatori

- I bioindicatori sono organismi viventi integratori di dati ambientali, sensibili agli inquinanti (SO_2 , NO_x , O_3 , IPA, Metalli pesanti, Radionuclidi,...) che mostrano una correlazione lineare tra sintomo ed emissioni di inquinanti nell'ambiente.
- Attraverso determinate alterazioni osservabili a livello cellulare, di organismo o di comunità indicano alterazioni di parametri ambientali
- I bioaccumulatori sono organismi viventi che tollerano e accumulano elevate concentrazioni di inquinanti (specialmente Metalli pesanti, IPA, Radionuclidi,...).
- L'analisi chimica del contenuto di inquinanti nei tessuti del bioaccumulatore, riferito a condizioni normali di controllo, può fornire utili indicazioni, spaziali e temporali, sulle deposizioni di inquinanti.

VANTAGGI della bioindicazione rispetto alle indagini strumentali:

- 1) **ECONOMICITA'**;
- 2) **INDICA UNA RISPOSTA SINERGICA DI PIU' FATTORI**;
- 3) **memoria storica e spaziale dei fenomeni in un dato ecosistema**;
- 4) **bioindicatori sono "organismi sentinella" - individuazione di perturbazioni precoci ed intermittenti**;
- 5) **Ci danno una idea degli effetti reali e gli stressori sulle comunità biotiche**;
- 6) **Forniscono info sugli effetti di "inquinanti" sconosciuti sulle associazioni di organismi**;
- 7) **valutazione di parametri non misurabili strumentalmente: complessità biologica, valore ecologico**;
- 8) **redazione di carte tematiche, con tempi e costi minori, utili per confrontare nello spazio e/o nel tempo variazioni di parametri ambientali**

SVANTAGGI della bioindicazione rispetto alle indagini strumentali:

- a) stime indirette, spesso non selettive, mentre gli strumenti misurano singoli fattori;
- b) valutazioni meno precise ed oggettive delle misure strumentali;
- c) misure che spesso sono il risultato di una attività stagionale, mentre lo strumento può funzionare tutto l'anno;
- d) il dato biologico, anche se confrontabile con altre situazioni, non è sempre formalizzato da tabelle di riferimento;
- e) la raccolta del dato biologico richiede personale tecnico con preparazione più specifica, rispetto a quella richiesta per la lettura del dato strumentale;
- f) possibili fenomeni di adattamento alla perturbazione che si sta indagando, falsando il risultato della biovalutazione; gli strumenti di misura, se mantenuti efficienti, non subiscono nel tempo variazioni nelle prestazioni.

GENOTOSSICITA'

Le piante rispondono alla tossicità dovuta agli inquinanti producendo una serie di biomarcatori / endpoint che possono essere rilevati e analizzati a vari livelli di organizzazione. Tali rilevamenti possono riguardare (da: Burton 1986, Briat e Lebrun 1999):

- La morfologia;
- Cambiamenti a livello cellulare;
- Biochimico;
- Molecolare.

Tra i vari effetti biologici che l'inquinamento ambientale può causare, la **genotossicità** è un aspetto che riguarda il **danno al genoma o al DNA**.

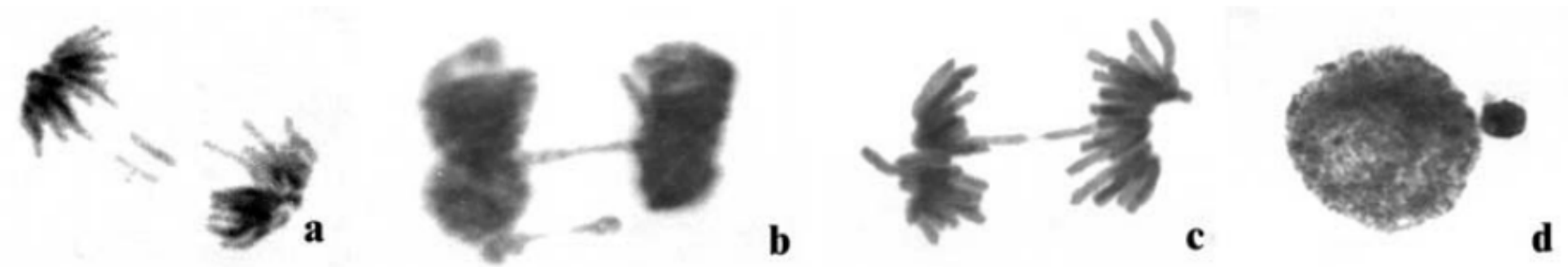


Figure 1 Chromosome aberrations in root tips cells of *Hordeum vulgare* after MH treatment: a – two fragments in anaphase; b – anaphase bridge and acentric fragment; c – anaphase bridge; d – interphase nuclei with micronucleus.

Le **aberrazioni cromosomiche** sono la conseguenza di **rottura del doppio filamento** del DNA che non è stata riparata o è stata riparata in modo improprio. Estremità cromosomiche rotte senza telomeri diventano "appiccicosi" e possono fondersi con altre estremità cromosomiche rotte. Il risultato di questi riarrangiamenti cromosomici sono frammenti acentrici, ponti dicentrici osservati nelle cellule mitotiche del primo ciclo cellulare dopo trattamento mutageno (Figura a-c) o micronuclei nella interfase del ciclo cellulare (Figura d).

From: Jolanta MALUSZYNSKA and Jolanta JUCHIMIUK 2004 - ORZO

MECCANISMI CHE DETERMINANO LA GENOTOSSICITÀ INDOTTA DA METALLI

I metalli possono legarsi ai gruppi **tiolici -SH** di diverse proteine come alcune delle DNA ligasi, DNA polimerasi, topoisomerasi II, glutatione reduttasi, tubulina o polipeptidi a basso peso molecolare per es. glutatione, e quindi **modificarne la loro attività** (e.g. Albinsky et al. 1999).

Esempi:

Il legame del metallo alla tubulina altera la funzione del fuso con conseguente **aneugenesi**.

Il legame con proteine cromosomiche come la topoisomerasi II **può provocare la clastogenesi**.

NOTE:

Il **glutathione** è un antiossidante che agisce contro i radicali liberi o molecole come perossido di idrogeno, nitriti, nitrati...e altre.

Radicale libero: un atomo o una molecola con un elettrone spaiato: in grado di legarsi ad altri radicali o di sottrarre un elettrone ad altre molecole vicine. Questa configurazione elettronica le rende altamente instabili e particolarmente reattive. I radicali liberi reagiscono facilmente con una qualsiasi molecola si trovi in loro prossimità (carboidrati, lipidi, proteine, acidi nucleici), danneggiandola e spesso compromettendone la funzione

Topoisomerasi: svolge ruolo nell'impacchettamento e nella replicazione del DNA. Più in dettaglio, essi sono in grado di introdurre una rottura del singolo o del doppio filamento di DNA in modo temporaneo

FORME DI PROTEZIONE:

-Oltre a disintossicare i metalli direttamente attraverso la coniugazione diretta, il **glutathione** essendo un importante antiossidante cellulare rimuove i **ROS** (Alscher 1989, Xiang e Oliver 1998). Il ciclo ascorbato-glutathione riduce H_2O_2 in acqua (Dixon et al 1998).

-Le piante sono anche protette da alcuni metalli da **fitochelatine** o **metalotioneine** di classe III, che sono polipeptidi.

Note:

Le **fitochelatine** si legano a vari metalli sottraendoli alla libera circolazione all'interno del citoplasma cellulare.

Le **metallotioneine** costituiscono una famiglia ubiquitaria di proteine localizzate nell'apparato del Golgi, con un'alta affinità per i metalli pesanti.

MECCANISMO DI TOSSICITA':

→ Metalli come Cd attivano la **γ -glutamil cisteina sintatasi** (Zhu et al 1999) o la **fitochelatina sintasi** (Clemens et al 1999, Vatmaniuk et al 1999) che aumentano la biosintesi del **glutathione e della fitochelatina**, rispettivamente. Il glutathione, è il substrato per la sintesi della fitochelatina, per cui man mano che si produce fitochelatina si esaurisce glutathione **stress ossidativo** (condizione patologica causata dalla rottura dell'equilibrio fisiologico fra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti) (Dietz et al, 1999). Ciò facilita la **perossidazione lipidica** (i lipidi contenenti acidi grassi insaturi e i loro esteri vengono direttamente ossidati) che porta alla formazione di **radicali liberi** che alla fine possono causare rotture del filamento di DNA e clastogenesi (e.g., Stohs e Bagcchi, 1995).

→L'altra modalità di azione con cui metalli come As, Cd, Co, Ni e Pb possono generare ROS è attraverso la partecipazione alla **reazione di Fenton** (Roy e Rossman 1992, Luo et al 1996, Lloyd e Phillip 1999).

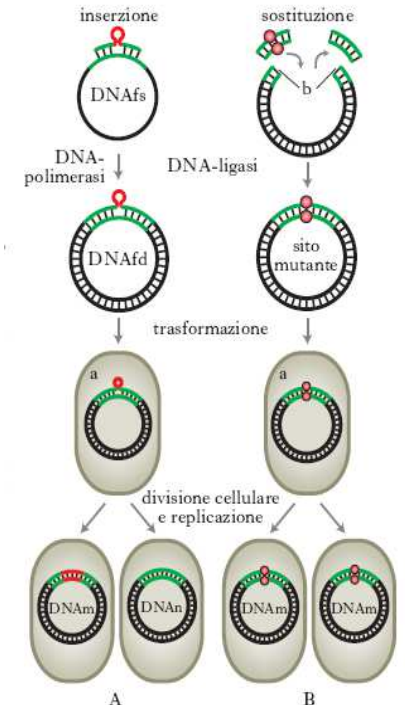


Come si può osservare i prodotti netti sono acqua e i due radicali idrossilico e perossidico.

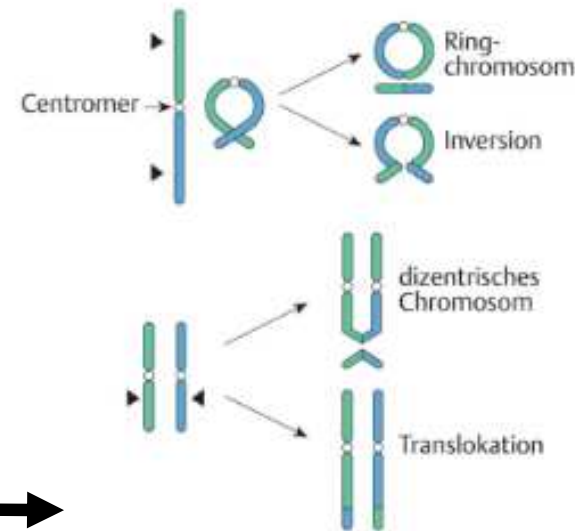
I PRINCIPALI EFFETTI GENOTOSSICI:

1. La mutagenesi - mutazione genetica o puntiforme, che determina un cambiamento nella sequenza del DNA all'interno di un gene;

2. La clastogenesi - cambiamento nella struttura cromosomica, che di solito si traduce in un guadagno o in una perdita o in un riarrangiamento di pezzi cromosomici all'interno del genoma;

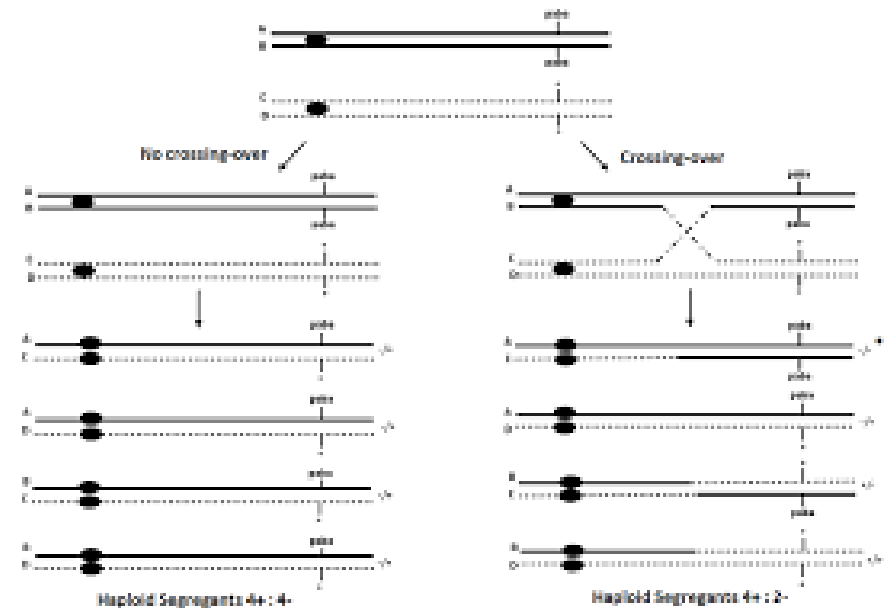
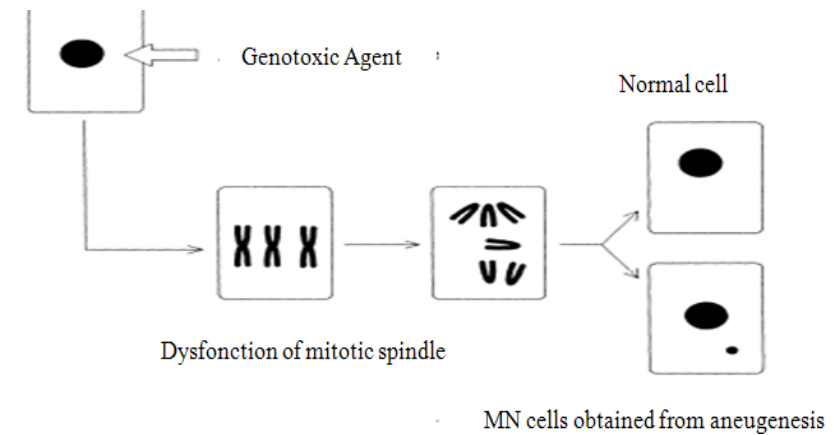


<https://www.treccani.it/enciclopedia/mutagenesi/>



3. L'aneuploidi - aumento o perdita di uno o più cromosomi (aneuploidia) o di un insieme aploide di cromosomi (euploidia);

4. La ricombinogenesi - scambio di segmenti omologhi o non omologhi tra cromatidi o cromosomi.



VANTAGGI E SVANTAGGI dell'utilizzo di saggi vegetali per i test tossicologici genetici

I vantaggi:

1. un numero di piante che hanno cromosomi più lunghi e di numero inferiore (Grant 1999).
2. le piante sono più facili da maneggiare;
3. Economico - particolare rilevanza per i paesi in via di sviluppo;
4. (in molti casi) più sensibile di altri sistemi disponibili (Constantin et al., 1982 Mutat Res 1982; 99: 37-49).

Limiti:

1. **ciclo di vita più lungo** della maggior parte delle piante rispetto a batteri, lieviti o drosofila;
2. alcune **differenze biochimiche** tra piante e mammiferi.

Le differenze tra cellule vegetali e animali hanno portato alla mancanza di un riconoscimento generale dei test di genotossicità delle piante. Tuttavia, ci sono molti rapporti sull'eccellente correlazione del sistema vegetale con il sistema dei mammiferi (Grant et al., 1998. Mutat Res 1994; 310: 187-209).

Ci sono circa **233 piante** che sono state utilizzate in vari aspetti della ricerca sulla mutagenesi (Shelby 1976).

Tra queste piante ricordiamo: *Allium cepa* ($2n = 16$), *Arabidopsis thaliana* ($2n = 10$), *Crepis capillaris* ($2n = 6$), *Glycine max* ($2n = 40$), *Hordeum vulgare* ($2n = 14$) *Tradescantia clones* ($2n = 12$), *Vicia faba* ($2n = 12$) and *Zea mays* ($2n = 20$) che sono utilizzate in analisi be di genotossicità con endpoint ben definiti.

Table 2: Plants assays with specific genetic toxicological endpoints.

| Assay system | Genotoxic endpoint | References |
|-----------------------------|--|--|
| <i>Allium cepa</i> | Mitotic cell division and chromosome aberration | Grant 1982, Fiskesjo 1997, Rank and Nielson 1993 |
| | MNC | Reddy et al 1995, Ma et al. 1995 |
| | SCE | Schwartzman and Cortes 1977, Panda et al 1998 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Comet (DNA strand break) | Navarrete et al 1997 |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | Embryonic and chlorophyll mutations in siliques | Redei 1982, Gichner et al. 1994 |
| <i>Crepis capillaries</i> | Mitotic chromosome aberration | Grant and Owens 1998 |
| <i>Glycine max</i> | Chlorophyll yellow/green twin spots or single spots indicating somatic crossing over or forward /reverse mutations | Vig 1982 |
| <i>Hordeum vulgare</i> | Mitotic and meiotic chromosome aberration | Constantin and Nilan 1982a, Panda et al 1992a) |
| | Chlorophyll mutations | Constantin and Nilan 1982b |
| <i>Tradescantia</i> | Pollen tetrad MNC | Ma 1982a, Ma et al 1994a |
| | Stamen hair specific locus mutation | Van't Hof and Schairer 1982, Ma et al. 1994b |
| | Mitotic cell division and chromosome aberration | Ma 1982b, Kanaya et al 1994 |
| <i>Vicia faba</i> | MNC | Ma et al. 1995, Degrassi and Rizzoni 1982 |
| | SCE | Kihlman and Kornberg 1975, Templaar et al 1982 |
| | Comet (DNA strand break) | Koppen and Verschaeve 1996 |
| <i>Zea mays</i> | Specific locus mutations | Plewa 1982 |
| | MNC | Wagner and Plewa 1985 |

Table 3. Genotoxicity of metals in plant assays.

| Metal | Clasto- genicity | Aneu- genicity | MNC | SCE | Comet | Gene mutation | References |
|-------------|---------------------|-------------------|---------|-----|--------|------------------|--------------------------------|
| Al (III) | + | - | | | | | 1. Fiskesjo 1988 |
| | (1,2) | (1,2) | | | | | 2. Liu et al 1995 |
| As (III) | | + | + | | | | 3. Fiskesjo 1997 |
| | | (3) | (4) | | | | 4. Steinkellner et al 1998 |
| Cd (II) | + | + | + | + | + | + | 5. Borboa and De la Torre 1996 |
| | (1,2,5-7) | (1,5,7) | (4) | (8) | (9)] | (10) | 6. Lerda 1992 |
| Cu (II) | - | - | - | | | + | 7. Rupshev 1976 |
| | (1,2) | (1,2) | (4) | | | (10) | 8. Panda et al 1996 |
| Cr (III) | + | + | - | | + | | 9. Koppen and Verschaeve 1996 |
| | (2,11) | (2,11) | (12) | | (9) | | 10.Reddy and Vaidyanth 1978 |
| Cr (VI) | + | + | + | | + | | 11.Liu et al 1992 |
| | (2,11,13) | (2,11) | (12) | | (9,13) | | 12.Knasmuller et al 1998 |
| Hg (II) | + | + | + | + | | + | 13.Rank and Neilson 1994 |
| | (1,13) | (14,15) | (16-19) | (8) | | (10) | 14.Fiskesjo 1969 |
| Ni (II) | + | + | + | + | | | 15.Ramel 1969 |
| | (1) | (1,2) | (12) | (8) | | | 16.Dash et al 1998 |
| Pb (II) | + | + | + | | | ± | 17.Panda et al 1989 |
| | (6,13) | (6,20) | (4)] | | | (10) | 18.Pnada et al 1990 |
| Sb (III) | | | - | | | | 19.Panda et al 1992b |
| | | | (12) | | | | 20.Ahlberg et al 1972 |
| Se (II) | + | ± | | | | | 21.Fiskesjo 1979 |
| | (21) | (21,22) | | | | | 22.Mukherjee and Sharma 1986 |
| Zn (II) | + | - | + | + | | | |
| | (5) | (5) | (4) | (8) | | | |

Tested positive (+), weakly positive (±) and negative (-)

Utilizzando alcuni dei suddetti saggi vegetali è stato possibile esaminare e monitorare metalli selezionati che mostrano effetti genotossici che includono:

-rottura cromosomica o aberrazioni strutturali (clastogenesi);

-malfunzionamento del fuso che influisce sul numero cromosomico (aneugenesi);

-MNC (tasso di cellule micronucleate);

-SCE (scambio dei cromatidi fratelli);

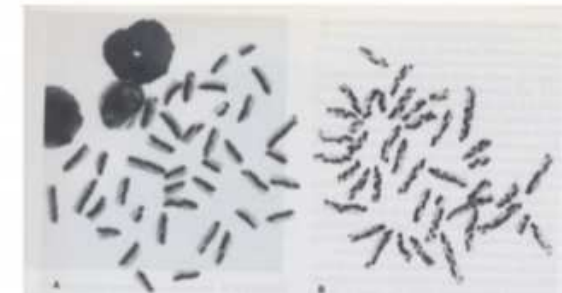
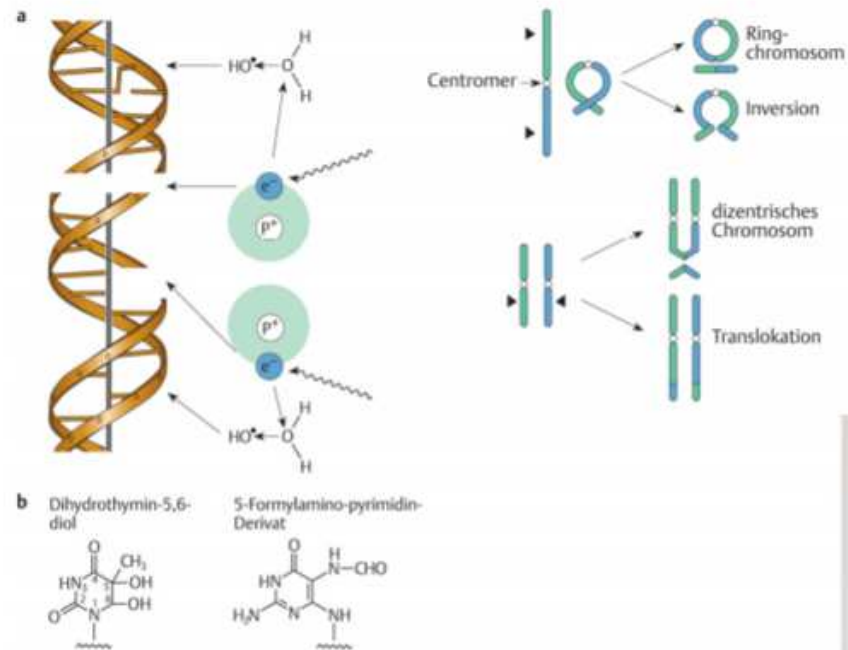
-rottura del filamento di DNA valutato dal «Comet» test.

CLASTOGENESI:

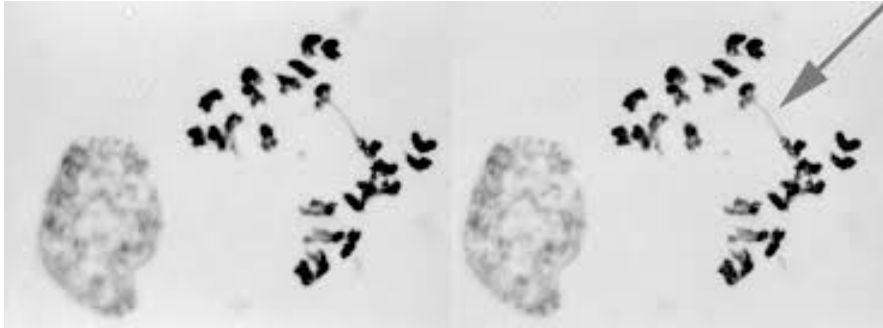
Gli agenti che agiscono direttamente sul DNA possono produrre rotture o scambi cromosomici/cromatidici, cromosomi dicentrici, cromosomi acentrici (Kihlman 1971, 1975)



clastogenesis



→ La **delezione terminale** o la **perdita dei telomeri** provoca la formazione di ponti e cromosomi appiccicosi in anafase (Nicoloff and Gecheff, 1976, Rank and Nielson 1993).



→ Specie su cui si fanno saggi per verificare la “clastogenesi” sono:

A. cepa (cipolla)



C. capillaris (radichella capillare)



H. vulgare (orzo)



Aneugenesis

Gli agenti che interagiscono con la funzione del fuso durante la mitosi o la meiosi causano errori di segregazione cromosomica che portano alla ploidia*.

Un buon numero di metalli con elevata affinità per i gruppi SH (gruppi tiolici) compromettono la funzione del fuso causando condensazione cromosomica e aneuploidia (Anderson 1986).
Metalli che generano Aneugenesis: Hg ma anche As, Be, Cd, Cr, Ni, Pb, Co e Se.

La **aneuploidia** è la condizione in cui **il numero totale di cromosomi di una cellula non è un multiplo di N (patrimonio aploide)**. Nell'uomo si possono verificare anomalie genomiche con eliminazione (monosomia) o aggiunta (trisomia) di un cromosoma, quindi si hanno 45 o 47 cromosomi.

*Con Ploidia si indica genericamente il numero delle serie (omologhe) di cromosomi presenti in una cellula, ogni serie si simboleggia con la lettera N. Ovvero, una cellula con una sola serie di cromosomi avrà ploidia 1 (1N) e si dirà dunque aploide. Nell'uomo la aploidia 1N, la diploidia 2N, sono condizioni che si definiscono di **euploidia** (buona ploidia). Infatti abbiamo, normalmente, cellule aploidi da 23 cromosomi (quelle della linea germinale - **spermatozoi e ovuli**); cellule diploidi (linea somatica), che costituiscono la maggior parte dei tessuti (46 cromosomi, 23 coppie di omologhi)

Induzione di MNC (Micronuclei)

Il test Plant MNC impiega ad esempio meristemi radicali di piante come *A. cepa* (Reddy 1995, Ma et al.1995) *Z. mays* (Wagner 1985) e polline di *Tradescantia* (Ma 1982a, Ma et al.1994a).

I micronuclei trovati nel citoplasma dell'interfase mitotica o delle cellule tetradiche può originarsi da un frammento cromosomico acentrico come risultato della clastogenesi o da un cromosoma ritardato dovuto all'aneugenesi. Il test MNC ha quindi la capacità di rilevare sia i clastogeni che gli aneugeni. Sulla base delle dimensioni e del tempo di comparsa della MNC dopo un breve trattamento, può essere ulteriormente possibile stabilire se l'agente di prova è un clastogeno o un aneugeno (Reddy et al 1995).

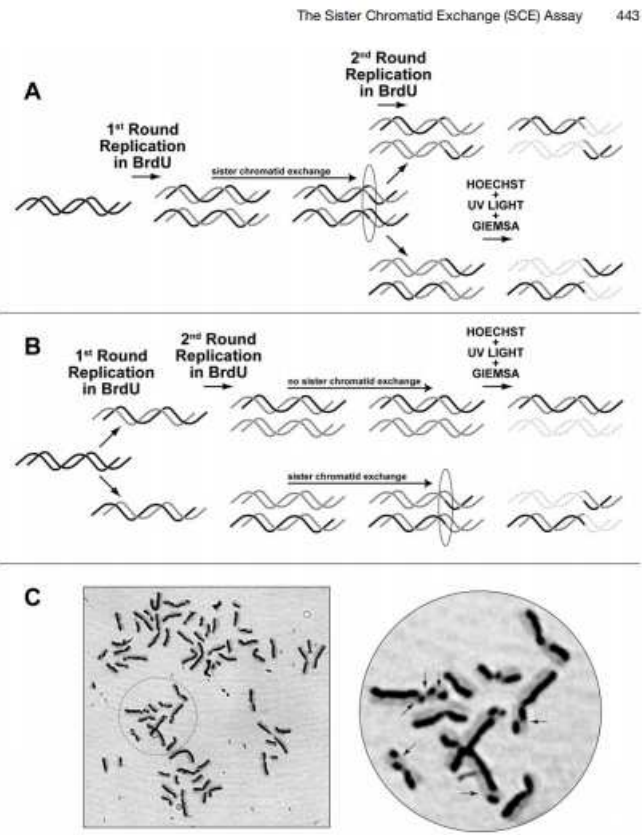
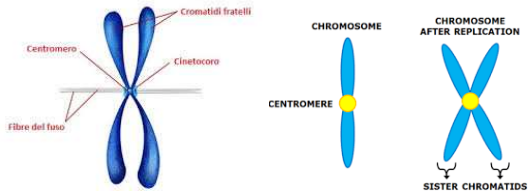
Metalli testati:

Come, Cu, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Sb, V, Zn

Induzione di SCE (scambio di cromatidi fratelli) - è lo scambio di materiale genetico tra due cromatidi fratelli identici. Da quattro a cinque scambi di cromatidi fratelli per coppia cromosomica, per mitosi è nella distribuzione normale, mentre 14-100 scambi non sono normali e rappresentano un pericolo per l'organismo.

Il test SCE si è dimostrato uno dei test di genotossicità a breve termine più sensibili grazie alla sua capacità di rilevare genotossine a concentrazioni molto basse (Tucker et al. 1993). Il test SCE è stato elaborato per una serie di piante che includono *A. cepa*, *V. faba*, *Picea abies*, *Nicotiana plumbaginifolia* ecc.

I cromatidi fratelli sono la coppia dei cromatidi uniti per il centromero, che derivano dalla replicazione di un cromosoma.



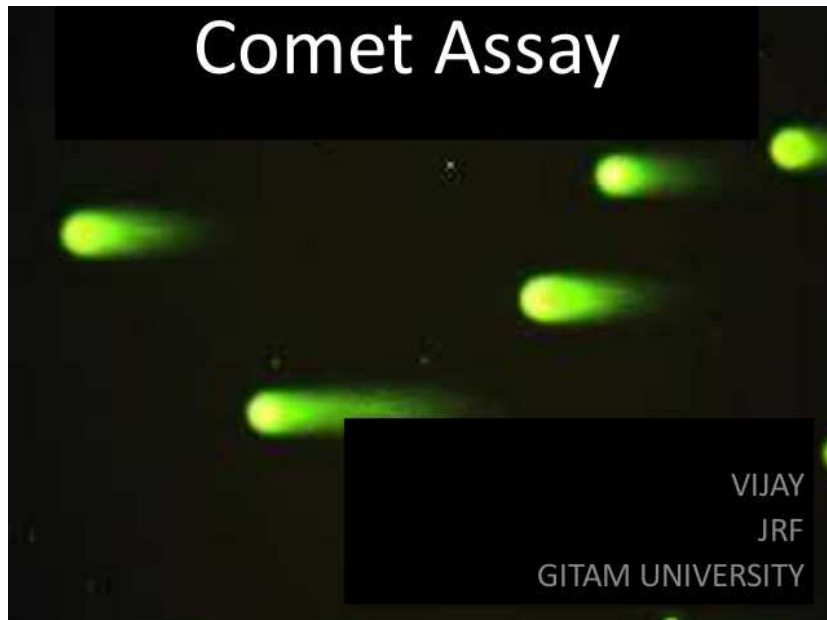
<http://www.ultranet.com/~jimibali/BiologyPages/H-Harlequin.html>

Comet Assay

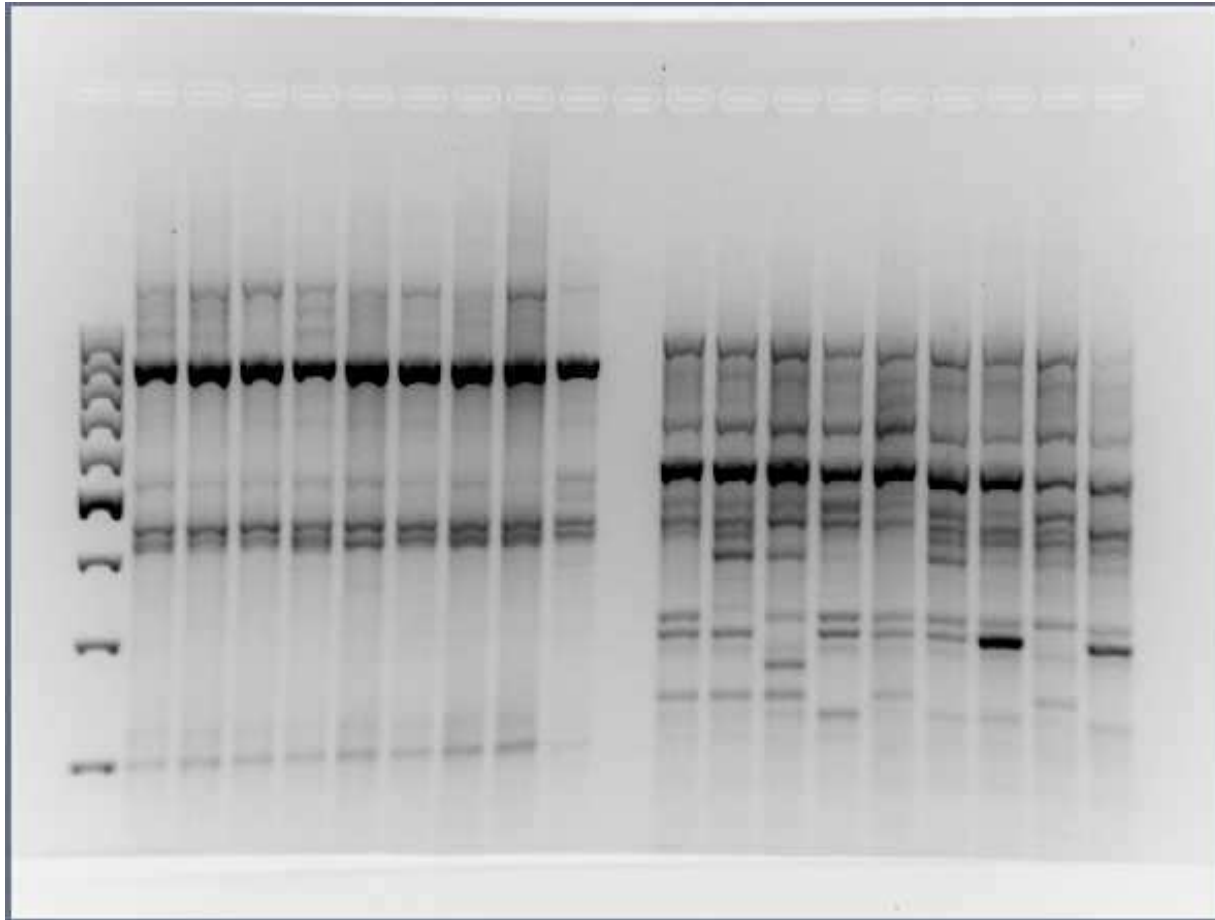
Il test della cometa, noto anche come **elettroforesi su singola cellula** è un test di genotossicità a breve termine. È stato sviluppato su cellule vegetali della radice o delle foglie.

I vantaggi rispetto ai test di aberrazione cromosomica convenzionale, MNC o SCE, sono che il test della cometa è **più sensibile per il rilevamento di bassi livelli di danno al DNA**, il requisito per un piccolo numero di cellule o nuclei per campione, la sua flessibilità, basso costo, facile applicazione e breve tempo necessario per completare uno studio (Tice et al. 2000).

Il test della cometa può essere facilmente eseguito in quasi tutte le cellule eucariotiche che coprono una vasta gamma di piante e animali, e quindi possiede un'ampia applicabilità per la valutazione della genecotossicità dell'inquinamento ambientale.



La finalità del test è quella di verificare la capacità **clastogena** di una sostanza chimica o di un agente fisico, ovvero di saggiare se questa sia in grado di generare **danni strutturali nei cromosomi**, con conseguenti mutazioni cromosomiche. I danni possono essere **rotture del singolo filamento di DNA** (SSB, single strand breaks) o **del doppio filamento** (DSB, double strand break): in entrambi i casi, a seconda delle condizioni sperimentali, **possono formarsi frammenti cromosomici**.



I marcatori molecolari basati sulla PCR (reazione a catena della polimerasi –amplifica e quantifica il DNA) - (a SX esempio di una ISSR- inter simple sequence repeat) possono rivelare la presenza di mutazioni puntiformi del DNA. Per questo motivo, sono stati utilizzati con successo per rilevare vari tipi di danni al DNA e mutazioni nelle piante indotti dall'esposizione sperimentale agli inquinanti (presenza polimorfismi)

INTERAZIONI TRA METALLI ED ALTRI INQUINANTI:

Gli organismi, comprese le piante, possono essere esposti ai metalli in associazione con altri agenti tossici.

Le interazioni possono generare
SINERGIA E ANTAGONISMO



Ad esempio alcuni metalli somministrati dopo il trattamento con raggi gamma, interagiscono sinergicamente determinando un'alta frequenza di mutazione della clorofilla in piante di Orzo. Alcuni metalli come il Mn, che di per sé non è mutageno, amplifica la mutagenicità delle radiazioni.

L'**antagonismo** dei metalli contro la genotossicità di vari mutageni e metalli tossici è ben documentato e viene definita "metallo-adaptive response" (Subhadra and Panda 1994, Panda et al 1997). Studi hanno dimostrato che piante già contaminate con metalli come il Hg o Cd sviluppano un certo grado di adattamento / resistenza e quindi diventano meno suscettibili quando successivamente trattate con agenti mutageni o genotossici.

È stato ipotizzato il possibile ruolo dei meccanismi disintossicanti adattivi che coinvolgono agenti chelanti di metalli come **glutathione, fitochelatine, metallothioneine, risposte antiossidanti e / o processi di riparazione del DNA, alla base della risposta metallo-adattativa** (Sanita di Toppi and Gabrieli 1999, Panda et al. 2000).