
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

GIANNI A. AMIRANTE, NADIA SRÀ

Effetti di due diserbanti sul quadro ematico e sierologico di *Xenopus laevis* Daud

Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 67 (1979), n.3-4, p. 265-271.

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1979_8_67_3-4_265_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Zoologia. — *Effetti di due diserbanti sul quadro ematico e sierologico di Xenopus laevis Daud* (*). Nota (**) di GIANNI A. AMIRANTE e NADIA SRA, presentata dal Socio S. RANZI.

SUMMARY. — This paper reports the effects of two pesticides (Brestan and Paraquat) on haematological and serological patterns of the clawed toad *Xenopus laevis* Daud. After 7 days of treatment and after 20 days of treatment Brestan and Paraquat demonstrate harmful effects, reducing or increasing erythrocyte, leucocyte, thrombocyte and serum protein levels. In addition, although Brestan is more toxic than Paraquat, together they often demonstrate irreversible, additive or synergic effects.

Col presente lavoro si è voluto studiare l'effetto di due pesticidi, il Brestan e il Paraquat, sul quadro ematico e sierologico dell'anfibio anuro *Xenopus laevis* Daud. Dei due diserbanti il Brestan è quello più tossico e quello i cui effetti sono meno noti, in quanto pochi sono in letteratura i lavori a tal proposito. Il Brestan è un fenil derivato (trifenil acetato di stagno). È usato comunemente contro la *Cercospora bieticola* ed anche, dato il suo vasto campo d'azione, come erbicida, fungicida, contro il cancro della corteccia del pioppo, come molluschicida. Agisce normalmente per contatto e viene irrorato direttamente sul fogliame o sciolto nell'acqua dei canali. Probabilmente agisce come inibitore della fosforilazione ossidativa [1-4], inibendo l'attivazione della ATPasi mitocondriale indotta da 2,4DNP, con effetto simile a quello dell'oligomicina [5, 6]. Inoltre pare che il Brestan alteri la permeabilità della membrana mitocondriale [7, 8]. La sua pericolosità sugli animali che vivono direttamente o indirettamente a contatto con ambienti inquinati da tale fitofarmaco (e quindi anche per l'uomo) è accentuata dal fatto che esso si accumula nel terreno e negli organismi vegetali ed animali. Peraltro gli studi sugli effetti di tale sostanza sugli animali sono pochissimi o comunque limitati alla tossicità acuta [8].

Il Paraquat (noto anche come Gramoxone) è un derivato dipiridinico (1,1-dimetil-4,4-dipiridilio-dimetil solfato). È stabile in ambiente acido, mentre si idrolizza facilmente in ambiente alcalino ed è molto solubile in acqua [9]. Viene usato per il diserbo di frutteti, vigneti, agrumeti, in orticoltura, nella presemina del riso e per il diserbo di canali e risaie. Si è visto che la luce aumenta, rendendo più rapidi, i sintomi della sua fitotossicità. Tale diserbante interferisce infatti sulla fotosintesi a livello della fase fotochimica [10]. La tossicità del Paraquat, per il suo caratteristico impiego, riveste particolare importanza nei confronti della selvaggina che si abbevera nei canali e nei

(*) Ricerche eseguite nell'Istituto di Zoologia dell'Università statale di Milano.

(**) Pervenuta all'Accademia il 25 settembre 1979.

corsi d'acqua dove viene disciolto [11], oltre che naturalmente per l'ittiofauna.

Si è potuto evidenziare che tale erbicida induce modificazioni a livello dell'apparato genitale negli embrioni di Uccello, causando pseudofemminizzazione [12], mortalità embrionale e lesioni polmonari [13, 14]. Il Paraquat viene assorbito dalla pelle umana solo dopo prolungata esposizione. Brevi esposizioni possono causare tuttavia nell'uomo irritazioni e ritardi di cicatrizzazione; per inalazione può causare lesioni alle mucose nasali, insufficienza respiratoria, alterazioni polmonari (fibrosi), necrosi del fegato e dei tubuli prossimali del rene [15].

È interessante il fatto che in animali sottoposti a trattamento con Paraquat si riscontra una diminuzione nella sintesi di DNA e un incremento della sintesi proteica correlato con l'aumentato assemblaggio dei poliribosomi [16]. Il Paraquat pur presentando una notevole tossicità immediata ha il vantaggio, rispetto al Brestan, di essere biodegradabile a contatto del terreno.

Tenendo conto delle caratteristiche dei due composti in questione abbiamo voluto vedere innanzitutto se tali sostanze, anche in dosi molto basse e per tempi di somministrazione molto brevi, siano in grado di indurre delle alterazioni a livello ematico tali da provocare a lunga scadenza effetti dannosi sull'animale stesso; in secondo luogo si è voluto vedere se, dopo un breve trattamento, l'effetto di tali sostanze si prolunga nel tempo. Infine se i due fitofarmaci potessero presentare effetti additivi o sinergici.

A tale scopo sono stati trattati alcuni lotti di *Xenopus* per sette giorni rispettivamente con Paraquat, con Brestan e con Paraquat e Brestan assieme. Di ogni lotto alcuni animali sono stati sacrificati subito dopo il trattamento, mentre gli altri sono stati sacrificati solo dopo 20 giorni dal termine del trattamento.

Animali usati. - Sono stati usati 112 esemplari adulti maschi e femmine di *Xenopus laevis* Daud., suddivisi in vari lotti di 7 animali ciascuno, posti in vasche mantenute a temperatura costante di circa 15 °C. Ogni giorno l'acqua veniva cambiata e ad essa veniva aggiunta, a seconda dei casi, una quantità prestabilita di diserbante. Riferendoci alle dosi normalmente usate nelle pratiche agricole e in base a preliminari ricerche sulla dose letale 50 (DL₅₀) sono state stabilite le seguenti dosi:

Brestan: $3,7 \cdot 10^{-5}$ ppm di principio attivo; *Paraquat:* 0,025 ppm di principio attivo. Sono stati allestiti i seguenti lotti: 4 lotti di controllo; 4 lotti con Brestan; 4 lotti con Paraquat; 4 lotti con Brestan + Paraquat.

Ogni trattamento veniva effettuato per la durata di 7 giorni, dopo il quale due lotti di animali per ogni trattamento venivano sacrificati, quelli dei rimanenti lotti venivano messi in acqua pura per 20 giorni e indi sacrificati.

Prelievo del sangue. - Agli animali, sia trattati che di controllo, preventivamente anestetizzati con una soluzione di etil-uretano al 5%, veniva prelevato il sangue direttamente dal cuore mediante micropipetta. Una parte del sangue veniva usata per la conta dei globuli rossi, bianchi e dei trombociti in una camera contaglobuli di Bürker. Una parte veniva utilizzata per il calcolo della formula leucocitaria mediante striscio e colorazione secondo Papanheim.

Il rimanente sangue veniva fatto coagulare e il siero ricavato, conservato in fiale a -20 °C, veniva usato per le elettroforesi.

Elettroforesi in gel di acetato di cellulosa. - Il siero veniva fatto migrare in elettroforesi su strisce di gel di acetato di cellulosa in tampone Veronal pH 8,6 f.i. 0,03 per 45 min. a 250 volts. Dopo colorazione con blue Coomassie e diafanizzazione, le percentuali relative delle frazioni proteiche venivano calcolate mediante lettura in fotodensimetro.

Dai dati espressi nelle figg. 1-3 si può notare che i due fitofarmaci da noi studiati influiscono considerevolmente, già dopo sette giorni di trattamento, su alcuni dei parametri ematici e sierologici considerati.

In particolare a livello di proteine sieriche il Brestan altera considerevolmente la percentuale relativa delle α - e β -globuline che variano dai valori medi del 26 e 25,5 % rispettivamente al 32 e 29 %. Al contrario le γ -globuline si abbassano dal 32 al 22 %. Le albumine invece non variano significativamente. Sulle stesse proteine il Paraquat non esercita alcun influsso, se non a livello di γ -globuline che calano lievemente. Le due sostanze, somministrate assieme, dimostrano uno spiccato effetto sinergico almeno a livello delle α - e β -globuline. Le prime calano notevolmente (13 %), mentre le β -globuline salgono al 40 %.

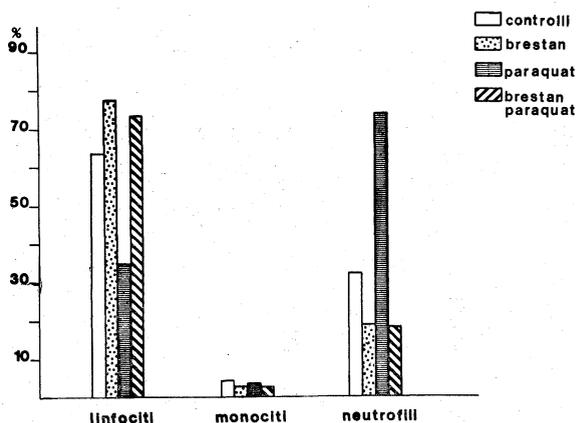


Fig. 1. - Percentuali degli elementi della serie bianca nei controlli e negli animali dopo 7 giorni di trattamento.

Anche la percentuale relativa degli elementi della serie bianca viene notevolmente alterata. Il Brestan da solo o assieme al Paraquat fa aumentare la percentuale dei linfociti dal 63,2 % al 77 e 74 %, mentre il Paraquat la fa scendere al 35,3 %. I monociti diminuiscono in ogni trattamento, anche se non considerevolmente. Il dato più interessante è senza dubbio quello concernente i neutrofili che vanno dal 33,5 % al 18 % col Brestan, e al 17,3 % col Brestan + Paraquat, mentre col Paraquat salgono al 73,1 %.

Per quanto riguarda il numero degli elementi figurati i due diserbanti hanno dimostrato un'indubbia azione sinergica. Infatti mentre sia il Brestan che il Paraquat singolarmente non influiscono significativamente sul numero di eritrociti e leucociti, assieme fanno variare il numero dei globuli rossi da $1,32 \cdot 10^6/\text{mmc}$ a $1,84 \cdot 10^6/\text{mmc}$ e di globuli bianchi da $8,2 \cdot 10^4/\text{mmc}$ a

$4,4 \cdot 10^4$ /mmc. I trombociti calano col Brestan e col Brestan + Paraquat da $19,1 \cdot 10^4$ /mmc rispettivamente a $7,8 \cdot 10^4$ e $6,0 \cdot 10^4$, mentre col Paraquat salgono a $26,2 \cdot 10^4$ /mmc.

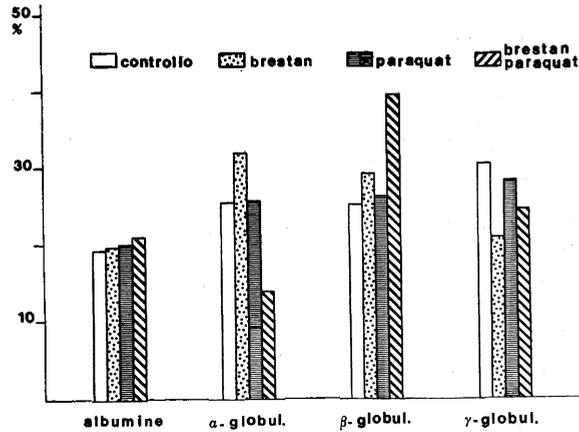


Fig. 2. - Percentuali delle varie siero-proteine nei controlli e negli animali dopo 7 giorni di trattamento.

Nelle figg. 4-6 sono invece riportati i valori medi dei vari parametri considerati, dopo un periodo di 20 giorni dal trattamento, periodo durante il quale gli animali sono stati tenuti in acqua pura. Per quel che concerne la

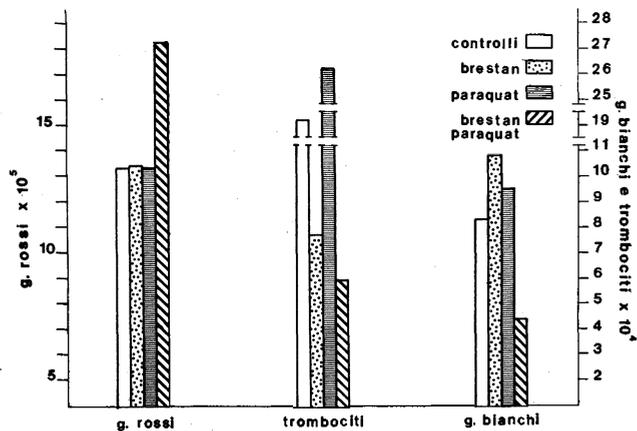


Fig. 3. - Numero/mm³ di globuli rossi, bianchi e di trombociti nei controlli e negli animali dopo 7 giorni di trattamento.

percentuale relativa delle frazioni proteiche del siero e degli elementi della serie bianca si può rilevare che laddove tali sostanze avevano dimostrato una drastica azione subito dopo il trattamento tale azione si mantiene costante nel tempo (almeno per 20 giorni), lasciando supporre un loro effetto irrever-

sibile. Non solo, ma per quel che riguarda i linfociti si può notare che l'effetto del Paraquat, si acuisce (26,2 %). Anche sui globuli bianchi e sui trombociti le due sostanze presentano un effetto tossico irreversibile. Per quel che riguarda i globuli rossi si può notare che dopo 20 giorni l'effetto tossico dimostrato dai

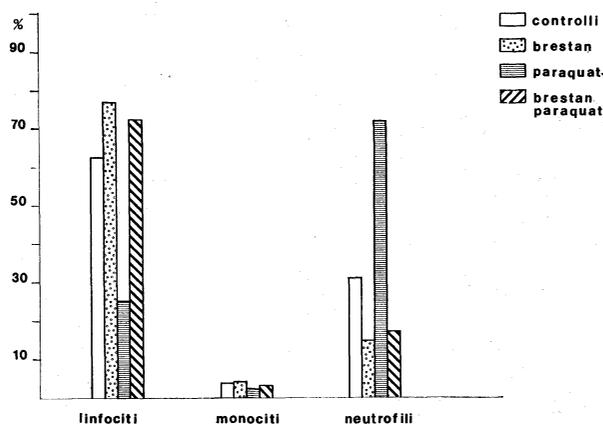


Fig. 4. - Percentuali degli elementi della serie bianca nei controlli e negli animali dopo 20 giorni dal trattamento.

due pesticidi somministrati assieme è reversibile, mentre si nota un'alterazione sul numero di emazie negli animali trattati o con Brestan o con Paraquat ($1,42 \cdot 10^3/\text{mmc}$ e $1,67 \cdot 10^3/\text{mmc}$ rispettivamente), alterazione che non si era manifestata subito dopo il trattamento.

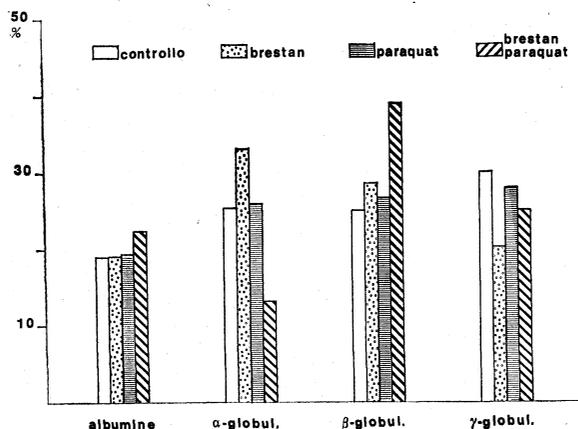


Fig. 5. - Percentuali delle varie siero-proteine nei controlli e negli animali dopo 20 giorni dal trattamento.

Da tutti i dati sopraesposti si può concludere in generale che un trattamento di pochi giorni con tali sostanze influisce drasticamente sul sistema ematico e sierologico degli Anfibii considerati, lasciando supporre un'azione

specifica a livello del fegato (variazione di alcune proteine sieriche) e degli organi emopoietici (milza, fegato, rene, ecc.). In particolare il calo sorprendente, in alcuni casi, dei leucociti e soprattutto dei linfociti ci autorizza a supporre una correlazione tra questo fatto e una probabile insorgenza di fenomeni tumorali causata dal forte calo della barriera immunologica e linfocitaria.

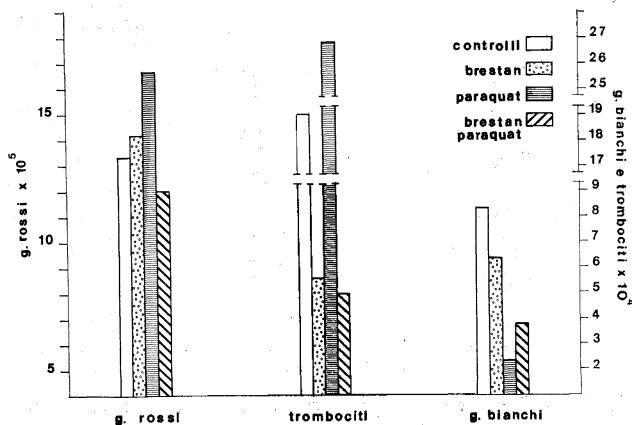


Fig. 6. - Numero/mm³ di globuli rossi, bianchi e di trombociti nei controlli e negli animali dopo 20 giorni dal trattamento.

Il dato più interessante comunque è che le due sostanze, somministrate assieme, mostrano sempre, sui parametri da noi considerati, un effetto dannoso. In alcuni casi l'effetto delle due sostanze somministrate assieme si è dimostrato additivo o sinergico, negli altri casi è sempre il Brestan che si dimostra più tossico. L'effetto di tali sostanze inoltre, anche dopo 20 giorni dalla loro somministrazione, si mantiene irreversibile (ad eccezione di un unico caso) o addirittura si accentua.

La drasticità degli effetti riscontrati lascia supporre qualcosa di più grave di una comune risposta degli animali a uno stress dovuto a inquinamento ambientale.

Se si considera inoltre il breve periodo di trattamento e la lenta degradabilità, soprattutto del Brestan, e quindi l'alta probabilità che molti animali, nei vari periodi dell'anno, possano venire a contatto, almeno per pochi giorni, con tali sostanze, emerge con chiarezza tutta la gravità della dannosa pressione ambientale svolta da questi usi.

Alla luce di tali dati non si può che auspicare una seria e globale revisione delle normative riguardanti l'immissione in commercio e l'uso dei pesticidi di più largo impiego.

LAVORI CITATI

- [1] H. MARTIN e C. R. WORTHING (1977) - *Pesticidal Manual.*, Brit. Corp. Protection Council.
- [2] T. MULRHEAD (1971) - *Pesticides and freshwater fauna*, Acad. Press N. Y.
- [3] A. M. SISTO (1977) - *Repertorio sistematico dei Fitofarmaci*, S. I. F.
- [4] A. K. SIJPESTEIJN (1970) - *Biochemical modes of action of agricultural fungicides.*, « World Rev. Pest. Control », 9, 85.
- [5] A. K. SIJPESTEIJN, G. A. LUIJTEN and G. J. M. VAN DER KERK (1969) - *Organometallic Fungicides* - In D. C. Torgeson, Fungicides. Vol. II., Acad. Press N. Y.
- [6] K. BARTH, J. BRUGGEMANN, H. GOTTE, J. HEROK, O. R. KLIMMER and K. H. NIESAR (1964) - *Ernährungs physiologische, analytische und toxikologische Untersuchungen mit dem Fungizid Triphenylzinnacetat.*, « Zentr. Veterinaermed. », II, 1.
- [7] K. E. MOORE and T. M. BRODY (1961) - *The effect of Triethyltin on oxidative phosphorylation and mitochondrial Adenosine Triphosphatase activation*, « Biochem. Pharmacol. », 6, 125.
- [8] H. B. STONER (1966) - *Toxicity of Triphenyltin*, « Brit. J. Ind. Med. », 23, 222.
- [9] H. J. R. CORBETT (1974) - *The Biochemical Mode of Action of Pesticides*, « Acad. Press », London.
- [10] J. CASELEY (1970) - *Herbicide activity involving light.*, « Pestic. Sci », 1, 28.
- [11] L. LEPORATI, M. SPAGNESI, P. MELOTTI e A. ANDREUCCI (1974) - *Ricerche sperimentali preliminari degli effetti di alcuni fitofarmaci su specie selvatiche*, « Ricerche di Biologia della Selvaggina », 60, 1.
- [12] Y. LUTZ-OSTERTAG et C. HENOU (1974) - *Action du Paraquat sur le tractus urogenital de l'embryon de poulet et de caille*, « C. R. Sci. Biol. », 168, 304.
- [13] Y. LUTZ-OSTERTAG et C. HENOU (1975) - *Paraquat: mortalité embryonnaire et effets sur l'appareil pulmonaire de l'embryon de poulet et de caille*, « C.R. Acad. Sci. Paris », 281, 439.
- [14] H. LUTZ and Y. LUTZ-OSTERTAG (1974) - *The action of different pesticides on the development of bird embryos*. In M. A. Klimberg « Drugs and foetal Development », « Plenum Pub. Corp. N. Y. », 127.
- [15] P. SMITH and D. HEATH (1975) - *The pathology of the lung in Paraquat poisoning*, « Roy. Coll. Pathol. », 28, 81.
- [16] G. K. VAN OSTEN and J. E. GIBSON (1975) - *Effect of Paraquat on the biosynthesis of Deoxyribonucleic acid, Ribonucleic acid and Protein in the Rat*, « Fd. Cosmet. Toxicol. », 13, 47.