

# Introduzione alla prima edizione

## L'origine e lo sviluppo della ricerca nel settore della Mutagenesi Ambientale

di Nicola Loprieno

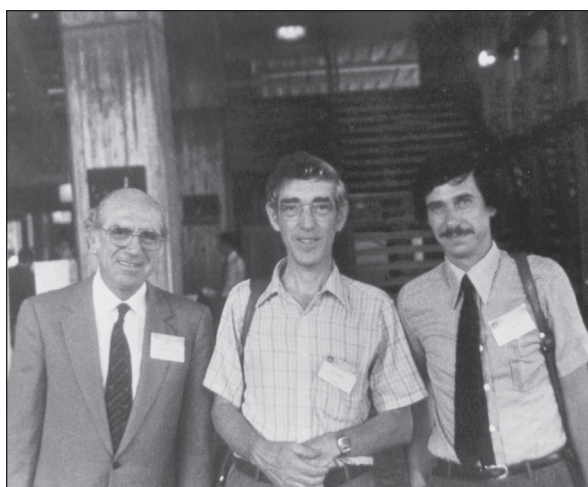
Questo capitolo è dedicato alla memoria del Prof. Roberto Guglielminetti, scomparso prematuramente nel 1973, mio amico e collega nei primi dieci anni dello sviluppo di questo settore di ricerca a Pisa

L'origine e il primo sviluppo della Mutagenesi Ambientale sono riconducibili a un numero limitato di ricercatori in diversi Paesi dell'Europa e del Nord America. Con i loro studi essi hanno gettato le basi scientifiche – sia pure con argomenti individuali – di un corpo di conoscenze che oggi ha raggiunto il massimo consolidamento scientifico sperimentale e teorico, pari a quello di altri settori di ricerca e di conoscenza all'interno delle scienze genetiche.

Charlotte Auerbach (Edinburgh, UK), Fritz H. Sobels (Leiden, NL), Udo Ehling (Munich, D), Gosta Zetterberg (Uppsala, S); Bruce N. Ames (Berkeley, USA), Alexander Hollaender e Fred De Serres (Oak Ridge, USA), Francesco D'Amato e Nicola Loprieno (Pisa), Giorgio Morpurgo, Angelo Carere, Gregorio Olivieri (Roma) e Giovanni Magni (Parma) possono essere considerati, a ragione, tra i ricercatori che hanno dato vita tra il 1945 e il 1970 a quei programmi di ricerca che, nel tempo, sarebbero passati dal settore tradizionalmente scientifico a quello ambientale, in senso generale, che giustamente definisce questo grande settore degli studi di Mutagenesi (fig. 1).

L'ispiratrice e la fondatrice di tutto il settore della ricerca sulla mutagenesi chimica prima, e della mutagenesi ambientale dopo, è stata indubbiamente Charlotte Auerbach, soprattutto negli anni in cui ella dirigeva la Mutagenesis Research Unit del Medical Research Council presso l'Institute of Animal Genetics dell'Università di Edimburgo (Scozia), la prima istituzione scientifica di ricerca riconosciuta a livello nazionale e internazionale nel settore della mutagenesi teorica e sperimentale.

La Auerbach pubblicò il suo primo lavoro sperimentale sulla mutagenesi chimica nel 1946 ma, come rivela lei stessa nel 1951, «Sono trascorsi appena 10 anni da quando il Dr. H. Müller (1941), nell'ultimo Cold Spring



**FIGURA 1**

Alcuni dei protagonisti della Mutagenesi Ambientale; da sinistra: Nicola Loprieno, Bruce N. Ames e Angelo Carere.

Harbour Symposium sul gene e le mutazioni, aveva detto che i tentativi di indurre mutazioni mediante sostanze chimiche non avevano ancora prodotto risultati chiaramente positivi. A dire la verità, quest'affermazione già allora non era vera: risultati chiaramente positivi erano stati ottenuti qualche settimana prima [dell'affermazione di Müller] con il gas mostarda, ma, a causa di ragioni di sicurezza nazionale che proibivano la pubblicazione di ricerche di guerra, questi risultati sono stati tenuti segreti fin poco dopo la guerra» (Auerbach e Robson, 1942, 1947).

Durante la Prima guerra mondiale i farmacologi erano stati colpiti dalla somiglianza esistente tra le ustioni prodotte sulle persone dalle radiazioni X e dal gas mostarda (gas asfissiante usato abbondantemente in tale guerra e

anche dopo!), che rimarginavano debolmente e successivamente si riaprivano. Nel caso dei raggi X si ipotizzava che tale processo dipendesse dalle lesioni cromosomiche indotte che interferivano con le mitosi. Da ciò l'ipotesi che il gas asfissiante potesse indurre aberrazioni cromosomiche e quindi mutazioni. La Auerbach, utilizzando questa ipotesi, condusse esperimenti di induzione di letali recessivi in *Drosophila*, ottenendo frequenze di mutazione comprese tra il 7% e il 24%.

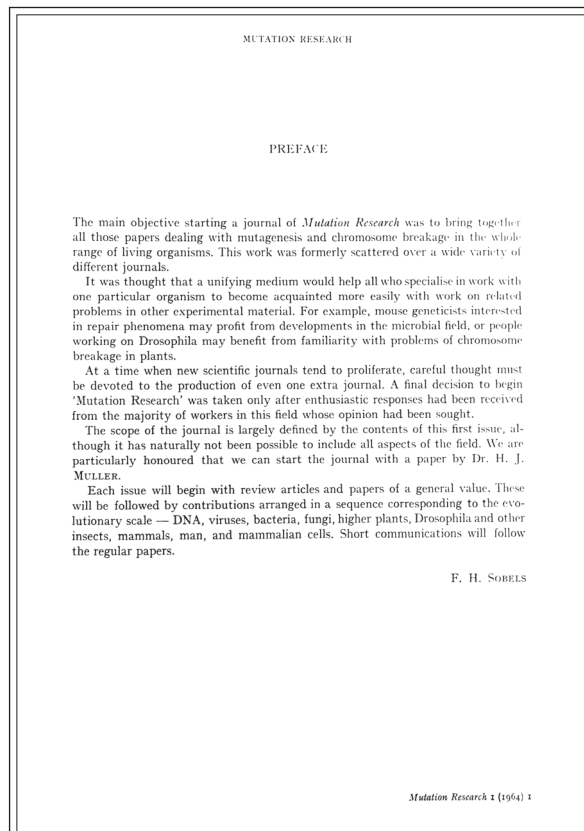
Oltre al diretto contributo dato dalla Auerbach all'avvio delle ricerche sulla mutagenesi chimica, sono da ricordare i risultati ottenuti da F. Oehlkers con i mutageni chimici sulle piante e quindi, alcuni anni dopo e indipendentemente, anche da M. Vogt con l'etil-uretano su *Drosophila*, da E. Hadorn e H. Niggli con il fenolo sempre su *Drosophila* e da J.A. Rapoport con la formaldeide ancora su *Drosophila*, e poi con diverse sostanze alchilanti. In Italia il primo ricercatore a interessarsi ai mutageni chimici fu F. D'Amato, con le sue ricerche sull'induzione di aberrazioni cromosomiche sulle cellule mitotiche di *Allium* nel 1949, dopo che egli ebbe appreso la giusta tecnica durante il suo soggiorno in Svezia.

Praticamente la mutagenesi chimica si è sviluppata ininterrottamente e con grande successo durante i 25 anni dopo la scoperta di C. Auerbach e collaboratori, coinvolgendo diversi ricercatori in moltissimi laboratori.

Sempre seguendo le parole della Auerbach, riportate in un altro lavoro fondamentale, «Le sostanze chimiche con proprietà mutagene dovrebbero essere particolari strumenti per analizzare i problemi connessi con le mutazioni. Se, come noi assumiamo, la mutazione è un processo chimico, di conseguenza la conoscenza dei reagenti chimici capaci di iniziare questo processo dovrebbe chiarire non soltanto la stessa reazione, ma anche la natura del gene, l'altro partner della reazione». Fu questa ipotesi che guidò le ricerche sulla mutagenesi chimica negli anni successivi, producendo risultati utili alla comprensione del processo della mutazione, senza però risolvere il problema della conoscenza del gene, la cui natura fu chiarita da altri tipi di ricerca.

1. Nell'Adriatico ancora oggi sono depositate sul fondo alcune centinaia di tonnellate di iprite, in bombole fatte affondare subito dopo il 1945 dal Comando Alleato per nascondere all'opinione pubblica il loro impiego durante la guerra. Nel corso nella prima guerra mondiale (1914-1918) i Tedeschi utilizzarono il gas mostarda nella cittadina di Ypres in Belgio (da cui il nome di iprite dato al gas mostarda), provocando 5000 vittime.

Il 2 dicembre 1943 la flotta alleata, attraccata nel porto di Bari, venne bombardata da un centinaio di aerei tedeschi, subendo forti danni. La nave alleata John Harvey scoppiò e colò a picco. Essa conteneva nelle stive 2000 bombole di iprite (100



## FIGURA 2

Presentazione della rivista *Mutation Research* da parte di F. H. Sobels in occasione della pubblicazione del primo numero.

Nel 1964 fu pubblicato il primo numero della rivista *Mutation Research* edita da F.H. Sobels, che avrebbe avuto un successo scientifico inaspettato in seguito, tanto da diventare l'accademia della mutagenesi chimica di base e poi molecolare e, immediatamente dopo, della mutagenesi ambientale (fig. 2). L'elenco degli editori comprendeva allora quattro italiani (F. D'Amato,

tonnellate) pronte all'uso nonostante la firma del trattato di Ginevra nel 1923 che impediva l'uso di gas asfissianti e/o tossici. Nell'attacco al porto di Bari vi furono 600 intossicati, con il corpo coperto di vesciche, cui seguirono diversi morti nelle successive 24 ore.

I Tedeschi comunque non erano stati da meno. Infatti prima della ritirata avevano distrutto un impianto chimico nei pressi di Foggia, dove producevano iprite, scaricando nell'Adriatico, in prossimità di Molfetta, Manfredonia, Trani e Margherita di Savoia, diverse tonnellate del gas chiuso in bombole che negli ultimi cinquant'anni sono spesso finite nelle reti dei pescatori dell'Adriatico.

L.L. Cavalli-Sforza, M. Fraccaro e G.E. Magni) ai quali successivamente si sono susseguiti altri validi colleghi. Questo primo numero comprendeva anche un lavoro sperimentale italiano, richiesto espressamente dall'editore al gruppo di F. D'Amato.

A partire dal 1965, essendo aumentato l'interesse verso i danni genetici prodotti dalle radiazioni ionizzanti (dalla bomba atomica lanciata su Hiroshima il 6 agosto 1945 e dopo), i ricercatori di genetica e di mutagenesi riuscirono a convincere la società del pericolo esistente anche per la potenziale induzione di mutazioni nella popolazione umana da parte di numerose sostanze chimiche sintetizzate per vari impieghi e risultate mutagene su una vasta serie di organismi animali, vegetali e microbici. Molte di queste sostanze rientravano in settori di applicazione industriale per la produzione di materie utilizzate in medicina, nell'industria chimica, nei pesticidi, nei conservanti degli alimenti, nei cosmetici ecc., settori che comunque comportavano un'esposizione più o meno rilevante della popolazione umana a materiale potenzialmente mutageno.

Nel 1969 fu pubblicato negli USA il rapporto MRAK da parte del Department of Health, Education and Welfare, in cui per la prima volta si raccomandava al Governo che tutti i pesticidi allora impiegati nella lotta alle malattie delle piante fossero sottoposti a test per la valutazione della loro potenziale mutagenicità, mediante i numerosi e semplici sistemi biologici che nel frattempo erano stati messi a punto in numerosi laboratori.

Il rilevante interesse suscitato dal possibile rischio per la salute umana rappresentato dalle sostanze mutagene e il forte impegno della ricerca sulla mutagenesi chimica negli Stati Uniti e in Europa determinarono la fondazione della Environmental Mutagen Society (EMS) in una storica riunione organizzata a Washington nell'aprile 1969, dove era anche presente una decina di ricercatori europei. Uno dei primi atti dell'EMS fu la costituzione di un registro delle sostanze chimiche valutate per la loro potenziale mutagenicità e dell'Environmental Mutagen Information Center (EMIC) a Oak Ridge, per volere di A. Hollaender e diretto da J. Wasson.

L'evento di Washington fu immediatamente seguito dalla costituzione della European Branch della EMS, con una riunione scientifica organizzata a Monaco di Baviera il 10 luglio 1970. Tale riunione, presieduta dal presidente della EMS, A. Hollaender, fu aperta dagli interventi di C. Auerbach sulle problematiche dei test in relazione all'interesse scientifico del processo di mutagenesi, di L. Ehrenberg, di Stoccolma, sui problemi chimici della mutagenesi ambientale, di G. Röhrborn, di Heidelberg, sui rapporti tra mutageni chimici e l'uomo, di N. Loprieno di Pisa, sulla specificità dei mutageni chimici.

Alla fine del maggio 1970 fu organizzato a Pisa dal Laboratorio di Mutagenesi e Differenziamento del CNR un

meeting scientifico su "Repair and Mutation in Microorganisms", che vide la partecipazione di diversi ricercatori sia stranieri sia italiani. Fu questa una delle prime conferenze internazionali organizzate in Europa sui problemi teorici relativi al processo della mutazione genica e ai meccanismi di riparazione del DNA.

Da allora iniziò a svilupparsi la mutagenesi ambientale in tutti i Paesi, compresa l'Italia: ogni anno la riunione annuale della Società Europea (European Environmental Mutagen Society, EEMS) ha visto la partecipazione di numerosi ricercatori, con sempre nuovi giovani partecipanti che hanno determinato lo sviluppo scientifico di questa branca.

Nel 1969 presso l'Istituto di Genetica dell'Università di Pisa fu istituito dal Consiglio Nazionale delle Ricerche il Laboratorio di Mutagenesi e Differenziamento, a riconoscimento degli studi avviati prima da F. D'Amato e poi da N. Loprieno nel settore della ricerca scientifica in questo campo. Questo laboratorio rappresentò in Italia il centro di riferimento per le problematiche della mutagenesi ambientale, riconosciuto in tutto il mondo per la rilevanza delle ricerche sviluppate e pubblicate in numerose riviste. Un catalogo pubblicato nel 1981 dalla Cattedra di Genetica della Facoltà di Scienze di Pisa elencava 125 lavori pubblicati nel settore della mutagenesi chimica e ambientale su riconosciute riviste scientifiche estere (*Radiation Research, Mutation Research, Genetics, Biochemical Research, Ambio, IARC Scientific Publications, Cancer Research, Chemical Toxicology of Food, Scand. J. Work Environmental and Health, Unschau in Wissenschaft und Technik, Acta Pharmac. Technology, Environmental Mutagenesis*).

Per la prima volta nel 1976 la Società Italiana di Cancerogenesi, nel suo 7° Congresso Nazionale, manifestò interesse per la mutagenesi, invitando Abbondandolo e Loprieno a presentare il loro punto di vista sulla relazione tra mutagenesi e cancerogenesi chimica.

Nel 1975 la riunione annuale della EEMS fu tenuta a Firenze, organizzata dal Laboratorio di Mutagenesi e Differenziamento di Pisa; nel biennio 1980-1982 N. Loprieno fu eletto a presiedere l'EEMS, a riconoscimento del contributo italiano alle ricerche di mutagenesi ambientale<sup>2</sup>.

L'11 ottobre del 1976 fu approvato dal Congresso degli Stati Uniti il Toxic Substances Control Act (TSCA), legge che regolava la registrazione delle nuove sostanze

2. Dal 2001 al 2003 è stato presidente dell'EEMS il Prof. Angelo Carere dell'Istituto Superiore di Sanità, anch'egli impegnato fin dai primi anni nel settore della mutagenesi.

chimiche immesse sul mercato statunitense; per la prima volta nella legislazione internazionale fu affermato il principio secondo il quale le sostanze chimiche di nuova immissione nel mercato dovevano essere sottoposte a studi di valutazione delle proprietà *cancerogene, mutagene, teratogene* secondo metodi rapidi, ripetibili ed economicamente accettabili.

L'approvazione di questa legge era stata preceduta nei due anni precedenti da intense discussioni sviluppatesi tra ricercatori specializzati nei nuovi settori della tossicologia, amministratori pubblici, industriali e legali. La ragione di questa legge è spiegata nelle prime frasi dell'Act stesso, allorché si afferma che l'umanità e l'ambiente, essendo esposti a una varia e numerosa serie di sostanze chimiche, debbono essere protetti da rischi non accettabili per la salute dell'uomo e per la conservazione dell'ambiente.

Tale legge, che doveva sostanzialmente cambiare i programmi di sviluppo delle industrie chimiche, la ricerca industriale applicata e la responsabilità dei produttori e degli amministratori pubblici, ebbe immediatamente una ripercussione mondiale, essendo il mercato delle sostanze chimiche diffuso fra tutti i Paesi moderni.

Nel 1979 il Consiglio delle Comunità Europee ha approvato una modifica (la Sesta) alla Direttiva 67/548/CEE sull'applicazione della legge, regolamenti e impegni amministrativi relativi alla classificazione, imballaggio ed etichettatura delle sostanze chimiche pericolose. La Sesta Modifica, indicata con il numero 79/831/CEE, fu approvata dal Consiglio il 18 settembre 1979 (3 anni dopo quella americana) e andò in vigore nei diversi Stati membri nel 1981, secondo la legge europea. In Italia la Sesta Modifica entrò in vigore con il Decreto del Presidente della Repubblica del 24 novembre 1981.

La legge europea impone al produttore di una nuova sostanza chimica la presentazione di un dossier contenente una serie di informazioni tra cui:

*All. VIII, Sezione 4 - Studi Tossicologici. Sottosezione 4.3 - Altri effetti:*

*4.3.1 Studi di mutagenicità (inclusi gli studi di prescreening della cancerogenicità)*

*4.3.2 La sostanza chimica deve essere esaminata mediante l'applicazione di due metodologie [per la valutazione della mutagenesi] di cui un test dovrebbe essere di natura batterica, con e senza l'attivazione metabolica, e un test non-batterico.*

La richiesta introdotta nella Legislazione Comunitaria sancisce così, anche per l'Europa, il principio dell'obbligatorietà della valutazione delle nuove sostanze chi-

miche, allo scopo di ridurre la diffusione nell'ambiente e sul mercato di sostanze potenzialmente pericolose per la costituzione genetica della popolazione.

Nella prima applicazione della legge fu intesa l'obbligatorietà di sottoporre le sostanze chimiche di nuova sintesi al test della *Salmonella typhimurium* (o test di Ames) e a un test scelto tra quello per l'induzione delle aberrazioni cromosomiche *in vitro*, su cellule di mammifero, quello dell'induzione delle aberrazioni cromosomiche *in vivo*, in cellule del midollo osseo di topo, o quello del micronucleo *in vivo* nel topo e nel ratto.

L'indicazione di queste precise metodologie semplici e ripetibili per la valutazione della mutagenicità delle sostanze chimiche derivò dalle ricerche di mutagenesi ambientale che si erano consolidate nel frattempo.

Nel 1972 iniziarono degli studi indipendenti negli USA e in Giappone per valutare l'efficacia di diversi sistemi di analisi a breve termine che sembravano promettenti per sostituire alcuni tipi di saggio a lungo termine effettuati su animali (per es. il test di cancerogenesi sui roditori della durata di 2-3 anni).

Nel periodo compreso tra il 1972 e il 1976 fu effettuato un programma di ricerca di mutagenesi sviluppato tra gli USA e il Giappone, i cui risultati dimostrarono un'alta correlazione tra l'attività cancerogena *in vivo* e l'attività mutagena *in vitro*.

Alla fine degli anni Settanta fu organizzato un Programma internazionale, l'International Study For The Evaluation of Potential Carcinogens, allo scopo di identificare il gruppo di sistemi di analisi di mutagenesi *in vitro* capaci di predire l'attività cancerogena o non-cancerogena delle sostanze chimiche.

Il Programma terminò nel 1979 e vide la sua pubblicazione soltanto nel 1981. Lo studio prevedeva l'analisi di 52 sostanze chimiche, di cui 25 erano già classificate come cancerogene e 17 come non-cancerogene. A esso parteciparono numerosi laboratori di diversi Paesi, per un totale di 57 test di mutagenesi indipendenti in *Salmonella*, nei lieviti, nelle cellule di mammifero ecc. Per l'Italia erano presenti il Laboratorio di Genetica dell'Università di Pisa e il Dipartimento di Biochimica dell'Università di Napoli.

Nel 1980 fu lanciato un secondo Programma di ricerca internazionale di mutagenesi ambientale allo scopo di selezionare una serie di metodologie atte alla valutazione delle sostanze mutagene: i risultati furono pubblicati nel 1985. A questo secondo Programma presero parte 60 laboratori di diversi Paesi, tra cui sei italiani.

Nel 1981 fu lanciato un terzo Programma di convalida dei metodi di mutagenesi, da parte dell'International Programme on Chemical Safety (IPCS) dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, dell'International Labour Organization e dello United Nations Environmental Programme (UNEP), con lo scopo di acquisire conoscenze

sul profilo di vari test a breve termine per la definizione di sostanze genotossiche *in vitro*.

Il Programma si concluse nel 1988 con una pubblicazione dell'OMS. La partecipazione di diversi gruppi di ricerca italiani a questo Programma internazionale documenta chiaramente lo sviluppo delle ricerche di mutagenesi ambientale nei settori specifici della ricerca di genetica, della microbiologia, della biochimica e dell'igiene nelle Università italiane. Questo sviluppo scientifico è testimoniato da due volumi del Consiglio Nazionale delle Ricerche, pubblicati a cura di G.E. Magni nel 1979 e 1980, nell'ambito del programma finalizzato "Promozione e Sviluppo della Qualità dell'ambiente". In questi due volumi sono raccolti i risultati degli studi sperimentali, le basi teoriche dei test di mutagenesi, le metodiche sperimentali per l'applicazione di test di mutagenesi *in vitro* e *in vivo* effettuati con la partecipazione di numerosi gruppi di ricerca italiani delle Università e di centri del CNR.

G.E. Magni, instancabile coordinatore di questo Programma, riuscì, attraverso diverse riunioni nazionali svolte in questo periodo, a catalizzare e orientare gli sforzi di ricerca di gruppi diversi di ricercatori per l'affermazione di metodologie di ricerca e di lavoro ancora oggi valide.

Agli inizi degli anni '80 i test di mutagenesi disponibili erano circa un centinaio, con caratteristiche di tecniche rapide, semplici, poco costose, sensibili e riproducibili.

La decade successiva ha visto un'intensa attività per convalidare e valutare i test o i set di test migliori per evidenziare sostanze genotossiche di particolare importanza (cancerogeni, mutageni per le cellule germinali). Gli studi condotti con questi saggi, sia *in vitro* sia *in vivo*, hanno dato un notevole contributo alla letteratura scientifica del settore.

Nell'ottobre 1991 è stata fondata in Italia la Società Italiana di Mutagenesi Ambientale (S.I.M.A., primo presidente il Prof. Nicola Loprieno), che è andata a unirsi a un panorama di analoghe Società europee e mondiali. Il seguito, tra gli anni '90 e oggi, è storia comune a molti – giovani e meno giovani – che si sono dedicati agli studi di mutagenesi.

I test di mutagenesi che sono stati messi a punto hanno il duplice scopo di determinare nel modo più veloce possibile se una sostanza ha un effetto tossico sul materiale genetico e di chiarire i meccanismi cellulari, citogenetici e molecolari che ne sono alla base.

Nel campo applicativo le valutazioni di mutagenesi ambientale hanno ormai convinto amministratori e legislatori nazionali e internazionali. In ambito europeo esistono ormai da diversi anni liste di sostanze mutagene, riconosciute per il loro potere di indurre effetti irreversibili nei diversi organismi, compreso l'uomo.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

ABBONDANDOLO A., LOPRIENO N., Relazione tra mutagenesi e cancerogenesi. Cancerogenesi chimica delle ossa, 7° Congresso Nazionale, Milano, pp. 77-88, 1976.

ASHBY J., DE SERRES F.J., DRAPER M. *et al.*, Evaluation of short-term tests for carcinogens. Report on the International Programme on Chemical Safety's Collaborative Study on *in vitro* Assays, Progress in Mutation Research, vol. 5, Elsevier, North Holland, Amsterdam, 1988.

ASHBY J., DE SERRES F.J., SHELBY M.D. *et al.*, International Programme on Chemical Safety (UNEP/ILO/WHO). Evaluation of Short-Term tests for Carcinogens, Voll. 1 e 2, Cambridge University Press, Amsterdam, 1988.

AUERBACH C., Induction of changes in genes and chromosomes. Cold Spring Harbour Symposium, *Quant. Biol.*, 1951.

AUERBACH C., The chemical production of mutations, *Science* 158(3805), pp. 1114-1147, 1967.

AUERBACH C., The dilemma of testing. Is the medium of our tests the message of our conclusion? Costituzione dell'European Branch della EMS, Munich, 1970.

AUERBACH C., ROBSON J.M., Chemical Production of Mutations, *Nature* 157, p. 302, 1946.

AUERBACH C., ROBSON J.M., Experiments on the action of mustard gas in *Drosophila*. Production of sterility and mutation, Report to the Ministry of Supply W3979, London 1942.

AUERBACH C., ROBSON J.M., The production of mutations by chemical substances, *Proc. Roy. Soc. Edin. B* 62, pp. 271-283, 1947.

CODIGNOLA A., Il farmaco che venne dalle profondità del mare, *Tempo Medico* 739, p. 9, 2002.

D'AMATO F., AVANZI M.G., Studio comparato dell'attività citologica di alcune essenze, *Caryologia* 1, pp. 175-193, 1949.

DE SERRES F.J., ASHBY J., Evaluation of Short-term Tests for Carcinogens. Report of the International Collaborative Programme «Progress in Mutation Research», vol. 1, Elsevier, North Holland, Amsterdam, 1981.

ERENBERG L., Chemical and biological viewpoints on the problem of environmental mutagenesis, Costituzione dell'European Branch della EMS, Munich, 1970.

HADORN E., NIGGLI H., Mutations in *Drosophila* after chemical treatment of gonadas *in vitro*, *Nature* 157, pp. 162-163, 1946.

LOPRIENO N., Control of Commercial Chemicals. The Sixth Amendment to the Directive on Dangerous Chemical Substances (79/831/EEC). Adopted by the Council of the European Communities, in De Serres, F.J., *Chemical Mutagens* 8, pp. 343-366, 1983.

LOPRIENO N., Specificity of chemical mutagens, Munich, 1970, Scientia, Annus LXV, V-VI-1971, Series VII, pp. 397-407.

LOPRIENO N., Test di Mutagenesi. Protocolli sperimentali e legislazione, cap. 7, Legislazione Italiana per il controllo delle sostanze chimiche, pp. 113-148, ETS, Pisa, 1982.

LOPRIENO N., ZETTERBERG G., GUGLIELMINETTI, MICHEL E., The lethal and mutagenic effects of *N*-nitroso-*N*-methylurethane and *N*-nitroso-*N*-ethylurethane in *Colletotrichum coccodes*, *Mutation Res.* 1, pp. 37-44, 1964.

OELKERS F., Die Auslösung von Chromosomenmutationen in der Meiosis durch Einwirkung von Chemikalien. 2. Indukt, *Abstraktum-n-VererbLehre* 81, pp. 313-341, 1943.

Public law 94-469, 94<sup>th</sup> Congress: An Act to regulate commerce and protect health and environment by requiring testing and necessary use restrictions on certain substances, and for other purposes, Oct. 11, 1976.

RAPOPORT J.A., Carbonyl compounds and the chemical mechanisms of mutations, *C.R. Doklady Acad. Sci. U.R.S.S.* 54, pp. 65-67, 1946.

RÖHRBORN G., Chemical mutagens and man, Costituzione dell'European Branch della EMS, Munich, 1970.

U.S. Department of Health, Education and Welfare, Report of the Secretary's Commission on Pesticides and their possible effects on health (The MRAK Report), December 1969.

Università degli Studi di Pisa – Cattedra di Genetica della Facoltà di Scienze, *Pubblicazioni relative alle ricerche sulla mutagenesi chimica*, pp. 1-25, 1981.

VOGT M., Mutationsauslösung bei *Drosophila* durch Athylurethan, *Experientia* 4, pp. 68-69, 1948.

WASSON J.S., The Literature of Chemical Mutagenesis, in A. Hollaender, *Chemical Mutagens* 3, pp. 271-287, 1973.