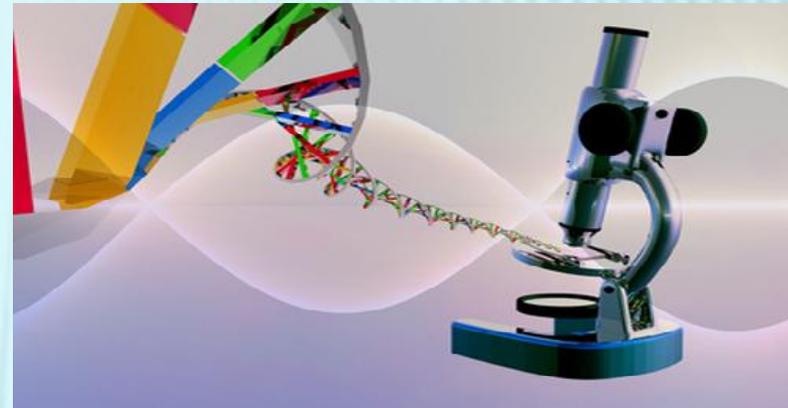


BIOMARKER

Strumenti diagnostici e prognostici di “salute” ambientale

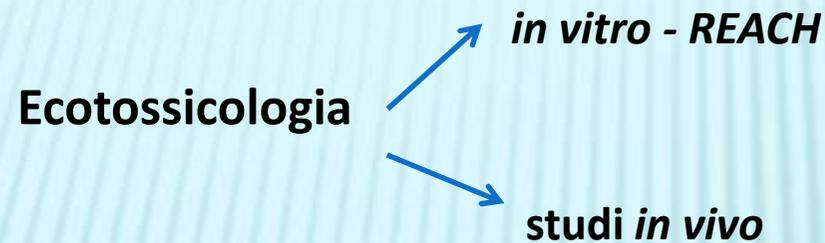


Dott.ssa Teresa Rosaria Verde



5. Biomarker

L'Ecotossicologica, sia che valuti i meccanismi d'azione delle sostanze, sia che riguardi i saggi di eco-tossicità per il monitoraggio ambientale, si basa principalmente su studi *in vivo*.



Un sistema *in vitro*, **sviluppato in ambito ecotossicologico**, dovrebbe essere in grado non solo di estrapolare gli effetti tossici *in vivo*, *ma* anche di fornire informazioni sulle risposte biologiche a livello di ecosistema



5. Biomarker



Da ISPRA, Manuali e Linee Guida 67/2011 - ISBN: 978-88-448-0498-5



“There is no alternative to REACH, but there will be no REACH without alternatives.”



- Il Regolamento REACH oltre a voler assicurare un elevato livello di protezione della salute umana e dell'ambiente (art. 1), ha, come obiettivo, **la promozione e lo sviluppo di metodi alternativi ai saggi *in vivo*, per la valutazione dei pericoli che** le sostanze chimiche comportano.
- Nel Regolamento REACH viene indicato che le informazioni da raccogliere in merito alla tossicità ed ecotossicità delle sostanze chimiche devono essere acquisite ***ricorrendo, ove possibile, a mezzi diversi dai test su animali vertebrati (art. 13).***
- I test su animali vertebrati devono essere considerati ***come ultima risorsa (art. 25)***, adottando, inoltre, delle disposizioni volte a limitare le ripetizioni inutili dei test ad es. mediante la condivisione, all'interno di ogni **SIEF (Forum per lo scambio di Informazioni sulle Sostanze)**, dei dati ottenuti mediante le prove sperimentali sia ***in vivo che in vitro (art. 30).***
- La Direttiva 86/609/EEC, precedente al Regolamento REACH, all'articolo 23, già incoraggiava gli Stati Membri a sostenere/promuovere iniziative in grado di ridurre (**Reduce**), migliorare (**Refine**) e sostituire (**Replace**) i saggi con animali di laboratorio impiegati per scopi scientifici e di ricerca.



“There is no alternative to REACH, but there will be no REACH without alternatives.”



La strategia delle ***“3R alternatives” (3Rs strategy) (Russell & Burch,1959)*** fa riferimento a tutte quelle procedure che riducono drasticamente il numero di animali utilizzati in ciascun esperimento, alleviano o minimizzano le sofferenze loro inflitte, sostituiscono in modo parziale o completo gli animali vertebrati con diverse tipologie di colture cellulari ***in vitro***.

E' stato appurato che il 70% circa delle procedure che infliggono grandi sofferenze agli animali sono dovute all'esecuzione di saggi di (eco)tossicità per scopi normativi.

Il Regolamento REACH considera per metodi alternativi, sia ***idonei metodi in vitro, che modelli di relazioni qualitative o quantitative struttura-attività o dati relativi a sostanze strutturalmente affini (art. 13 e Allegato XI***



5. Biomarker

Tipologia di test	Metodo	Classificazione	Strategia delle 3R (3Rs strategy)
Irritazione e corrosione cutanea	TER- Corrosione	<i>In vitro, ex-vivo</i>	Parziale sostituzione
	HSM - Corrosione	<i>In vitro</i>	Sostituzione
	CORROSITEX - Corrosione	<i>In vitro</i>	Parziale sostituzione
	EPISKIN - Irritazione	<i>In vitro</i>	Sostituzione
	EPIDERM - Irritazione	<i>In vitro</i>	Parziale sostituzione
	EPIDERM modificato	<i>In vitro</i>	Sostituzione
	SKINETHIC	<i>In vitro</i>	Sostituzione
Irritazione oculare	BCOP	<i>In vitro, ex-vivo</i>	Parziale sostituzione
	ICE	<i>In vitro, ex-vivo</i>	Parziale sostituzione
	RRET, IRE	<i>In vitro, ex-vivo</i>	Parziale sostituzione
	HET-CAM	<i>In vitro</i>	Sostituzione
Sensibilizzazione cutanea	LLNA	<i>In vivo</i>	Riduzione e miglioramento
Mutagenicità	MICRONUCLEO	<i>In vitro</i>	Riduzione
Tossicità acuta sistemica	FDP	<i>In vivo</i>	Sostituzione (sostituisce il test <i>in vivo</i> di tossicità orale acuta eliminato nella Dir. 2001/59/EC (Official Journal L225 2001))
	ATC	<i>In vivo</i>	Sostituzione (sostituisce il test <i>in vivo</i> di tossicità orale acuta eliminato nella Dir. 2001/59/EC (Official Journal L225 2001))
	UP AND DOWN	<i>In vitro</i>	Riduzione
Tossicità per la riproduzione	EST	<i>In vitro</i>	Parziale sostituzione
	MM	<i>In vitro, ex-vivo</i>	Miglioramento
	WET	<i>In vitro, ex-vivo</i>	Miglioramento
Fototossicità	3T3 NRU PT	<i>In vitro</i>	Sostituzione
Absorbimento cutaneo	SKIN ABSORPTION	<i>In vitro</i>	Sostituzione
Tossicità acuta con pesci	FTA	<i>In vivo</i>	Strategia di riduzione (non può essere considerato un test)

Legenda: *Ex-vivo*: l'esposizione avviene su organi asportati da animali sacrificati; *Sostituzione parziale* (Partial Replacement): sostituire parzialmente il metodo *in vitro*; *Sostituzione (Replacement)*: sostituire il test *in vivo*; *Riduzione e Miglioramento (Reduction and Refinement)*: ridurre il numero di animali e usa procedure meno aggressive; *Riduzione (Reduction)*: ridurre il numero di animali/test *in vivo*; *Miglioramento (Refinement)*: usa procedure meno aggressive, ad es. utilizza gli embrioni, quindi richiede solo il sacrificio del "reatore"; *TER*: Transcutaneous Electrical Resistance; *HSM*: Human Skin Model; *CORROSITEX*: *In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion*; *EPISKIN*: Artificial Skin Model for Skin Irritation (with *MIL* reduction and *IL-2* release); *EPIDERM*: Artificial Skin Model for Skin Irritation; *BCOP*: Barrier Corneal Opacity/Penability Test; *ICE*: Isolated Chicken Eye Test; *RRET, IRE*: Isolated rabbit conjunctival eye test; *HET-CAM*: Hen's egg test - chorio-allantoic membrane test; *LLNA*: Local Lymph Node Assay; *LLNA*: *Local Lymph Node Assay*; *FDP*: Ames and Toxicity - Fish Test Procedure; *ATC*: Ames test toxicity - Ames Test; *MM*: Micronucleus Test; *WET*: Whole rat Embryo Embryotoxicity test; *3T3 NRU PT*: *In vitro* 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test; *FTA*: Fish Threshold Approach.

Test alternativi (*in vitro* e *in vivo*) approvati o in fase di approvazione nella CE **Idonei indica metodi in vitro** convalidati (ad es. il saggio di mutagenicità con *Salmonella typhimurium* o test di Ames). Inoltre sono considerati **idonei anche i saggi in fase di** elaborazione sufficientemente avanzata secondo criteri riconosciuti a livello internazionale, come quelli adottati dal Centro Europeo per la Convalida dei Metodi Alternativi (ECVAM) per l'immissione di una prova nel processo di pre-convalida (ECHA).



Un passaggio essenziale *in vivo*  *in vitro*
.....ed in generale verso metodologie high-throughput (HTS) ed altro!

Regolamento REACH Art 40. La Commissione, gli Stati membri, l'industria e gli altri soggetti interessati dovrebbero continuare a contribuire alla promozione, a livello internazionale e nazionale, di metodi di prova alternativi alla sperimentazione animale, tra cui metodologie assistite da computer, appropriate metodologie *in vitro**, metodologie basate sulla *(eco) tossicogenomica ed altre metodologie* come ad es. **Biomarker e Biosensori**

*Con il termine *in vitro* si fa riferimento al modo in cui le componenti di un organismo vivente (cellule, tessuti, organi) sono mantenute al di fuori dell'organismo stesso, in un ambiente artificiale, controllato, isolate dai molteplici sistemi fisiologici che regolano le loro attività *in vivo*.

Metodi alternativi in vitro: colture cellulari di pesce



Questo progetto ha l'obiettivo di diffondere presso i laboratori delle Agenzie Regionali e Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA/APPa) dei saggi di citotossicità basale con linee cellulari stabilizzate di pesce da impiegare nello screening preliminare di valutazione dell'ecotossicità delle sostanze chimiche, in alternativa al saggio di tossicità a breve termine con pesci

Test Ecotossicologici previsti

		Invertebrate Fish juvenile growth Fish early life stage (ELS) Bioaccumulation	Invertebrate Plant Sediment (Birds)	LONG TERM
WATER Plant (algae) Crustacean (<i>Daphnia</i>)	Fish (acute)	Plant Invertebrate Microorganism	SOIL & SEDIMENT ORGANISMS	SHORT TERM
1-10 t/y	10-100 t/y	100-1000 t/y	>1000 t/y	

5. Biomarker

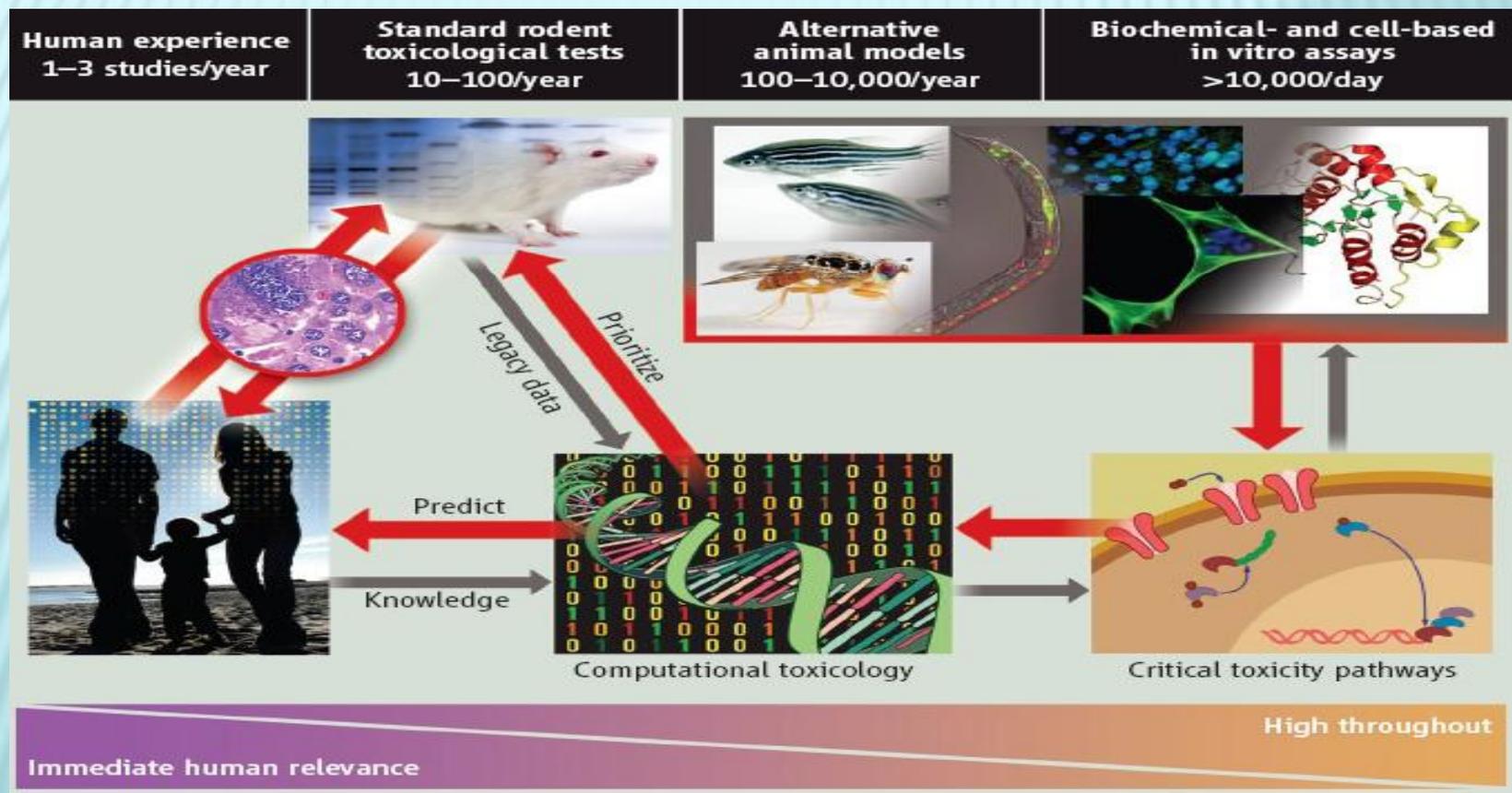
Regolamento REACH	SAGGI CON SPECIE ITTICHE	Linea guida OCSE
<u>Allegato VIII</u> ≥ 10 ton/anno	<ul style="list-style-type: none">● Saggio di tossicità a breve termine	GL n. 203: 1992.
<u>Allegato IX</u> ≥ 100 ton/anno	<ul style="list-style-type: none">● Saggio di tossicità a lungo termine con pesci adulti	GL n. 204: 1984
	<ul style="list-style-type: none">● Saggio di tossicità con pesci nelle prime fasi di vita	GL n. 210: 1992
	<ul style="list-style-type: none">● Saggio di tossicità a breve termine con pesci nelle fasi embrionali e di avannotto	GL n. 212: 1998
	<ul style="list-style-type: none">● Saggio di tossicità a breve termine con pesci nelle fasi embrionali e di avannotto	GL n. 215: 2000
<u>Allegato X</u> Identificazione di PBT -vPvT	<ul style="list-style-type: none">● Saggio di bioaccumulo	GL n. 305: 1996

Considerando che il saggio più usato è quello di tossicità a breve termine che sulla base del metodo OCSE 203 (3 repliche, 5 concentrazioni e 7-10 pesci/conc. e per controllo) sono necessari dai 126-180 pesci e questo per la valutazione di un singolo composto chimico!



5. Biomarker

La valutazione di tossicità nel XXI secolo: un nuovo pensiero ed una strategia”
Le metodologie *high-throughput* (HTS),



La nascita dei Biomarker

L'introduzione dei marcatori biologici ha rappresentato un salto di qualità rispetto ai metodi convenzionali.

In molti casi, in seguito ad immissioni accidentali di composti inquinanti nell'ambiente, i danni ecologici sono visibili; ma in altre situazioni gli effetti a lungo termine causati dalla presenza prolungata di bassi livelli di inquinanti, sono di difficile individuazione.

I Biomarkers

Uno dei problemi più importanti da affrontare nelle indagini ecotossicologiche riguarda *la valutazione dell'esposizione e dell'effetto di composti inquinanti sulle comunità naturali*.

L'ecotossicologia, per affrontare queste problematiche, ha gradualmente affiancato alle indagini di *biomonitoraggio, basate sulla stima dei livelli di residui negli organismi bioindicatori*, un nuovo approccio metodologico basato sulla valutazione delle *risposte che un organismo, una popolazione o una comunità naturale può generare, nei confronti di uno stress (fisico e/o chimico) ambientale*.

Ciascuna di queste risposte, comunemente definite come *biomarkers*, rappresenta un segnale integrato del livello di contaminazione di una determinata area e, di conseguenza, costituisce un indicatore del livello di rischio tossicologico a cui una determinata popolazione naturale può essere sottoposta.

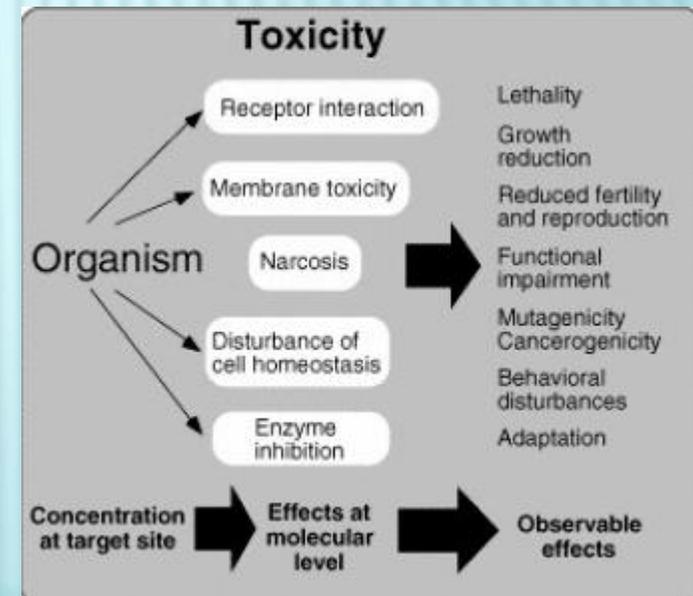


I Biomarkers

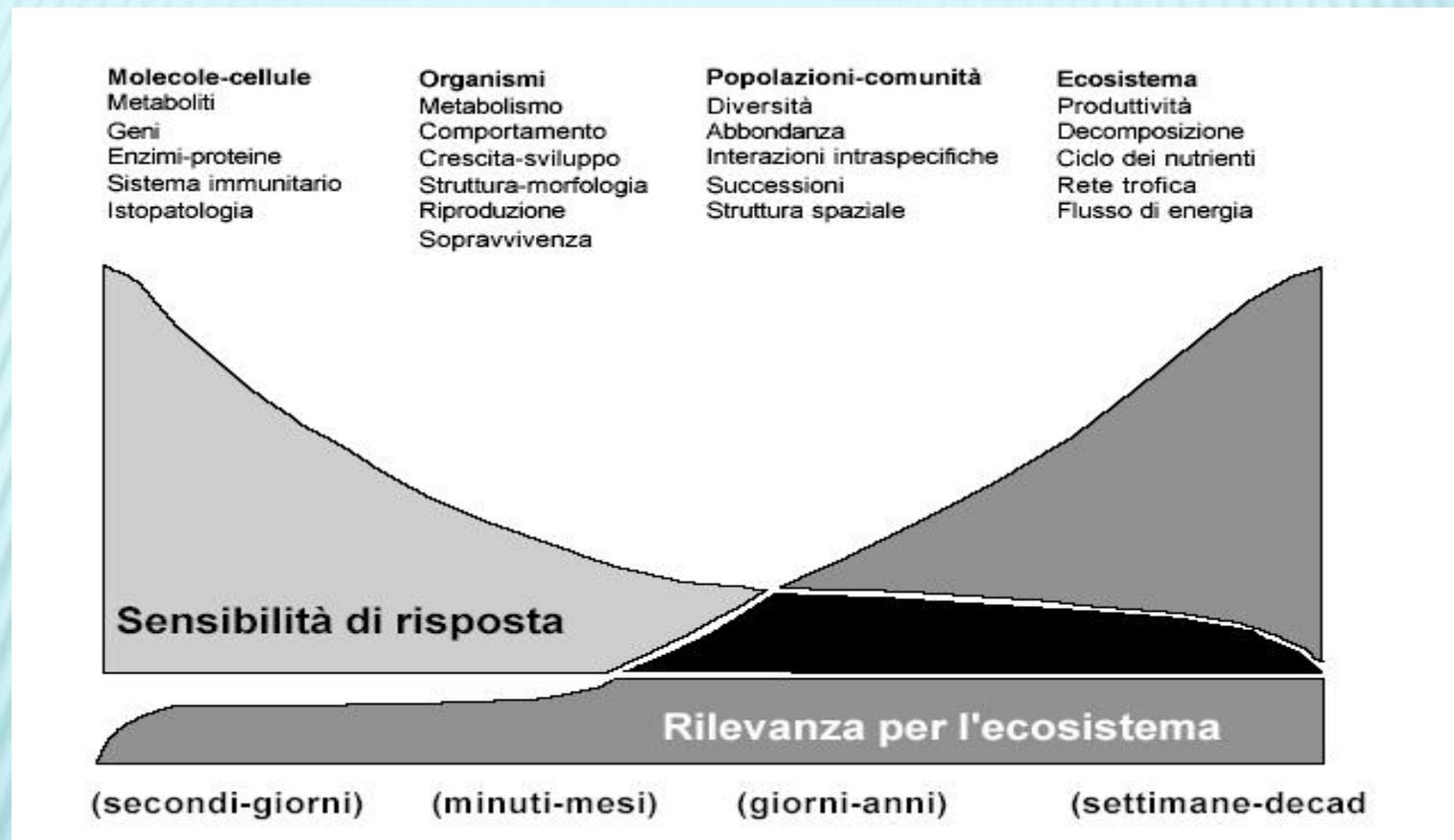
Una volta immesso nell'ambiente, qual è il BERSAGLIO PRIMARIO di un composto inquinante ?

DIVERSE VIE DI ASSUNZIONE

Quando un contaminante interagisce con la componente biotica di un ecosistema, terrestre, marino o di acqua dolce, può provocare una serie di alterazioni o danni a diversi livelli di complessità strutturale, i quali partendo dal danno molecolare, possono giungere a modificare la struttura dell'intera popolazione e comunità.



5. Biomarker



**Biomarker molecolari
effetti sub-letali**



Biomarkers: alcune definizioni

Viene generalmente definito come Biomarker *"...quella variazione, indotta da un contaminante, a livello delle componenti biochimiche o cellulari di un processo, di una struttura o di una funzione, che può essere misurata in un sistema biologico"* (NRC, 1989).

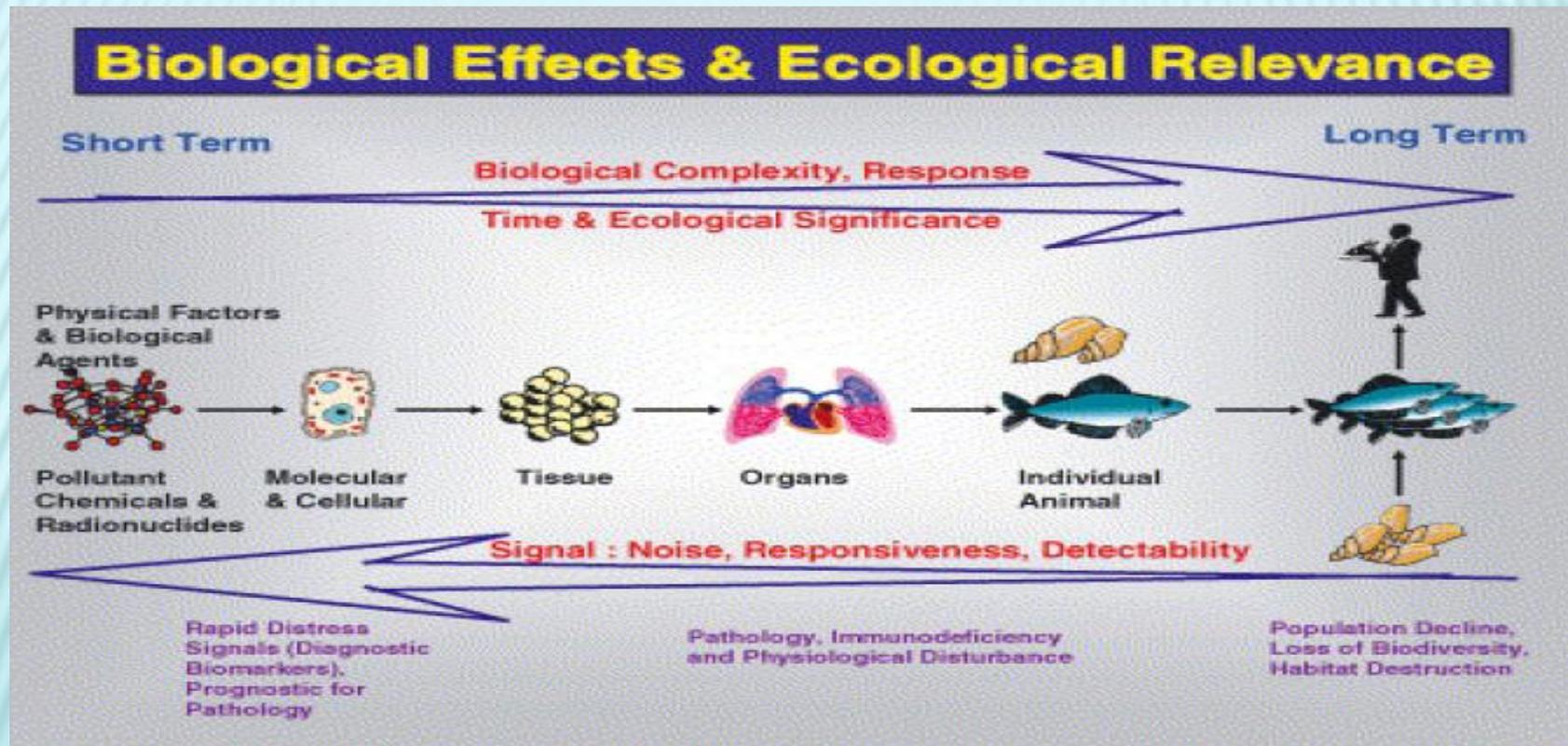
Biomarker ecotossicologico che lo definisce come *"quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo (individuo o popolazione), la quale fornisce l'evidenza di un'esposizione e/o un effetto ad uno o più composti inquinanti (e/o radiazioni)."* Depledge (1994)

Si considera quindi una variazione a livello biochimico, fisiologico, istologico, morfologico e comportamentale

Questo approccio metodologico pone alla base del suo essere il concetto di *intercorrelabilità degli effetti di un inquinante ai vari livelli di complessità strutturale.*



5. Biomarker



Dalle risposte a livello molecolare fino alle risposte a livello di popolazione si verifica un aumento del tempo di risposta, dell'importanza ecologica ed infine un aumento della difficoltà nell'individuazione della intercorrelabilità degli effetti.



Una distinzione importante: Bioindicatore e *Biomarker*

Con il termine di “**bioindicatore**” si vuole definire un qualsiasi organismo (animale, vegetale, batterio, protista, fungo) che può essere utilizzato come indicatore del livello di contaminazione di un determinato ambiente (cioè valutare la biodisponibilità degli inquinanti);

*Per lo svolgimento di una indagine ecotossicologica tramite l'utilizzo di **biomarkers** è quindi di primaria importanza la scelta a monte di un valido organismo bioindicatore.*

si considera come **biomarker** quella risposta o quelle risposte (molecolare/cellulare.....) che un organismo bioindicatore manifesta verso agenti stressanti (chimici o fisici).

5. Biomarker

L'obiettivo di tale monitoraggio ambientale è quello di :

Stimare (strumento diagnostico)

Prevedere (strumento prognostico)

Evitare eventi inaccettabili a livello ecologico, come l'insuccesso riproduttivo o l'incremento della mortalità nell'ambito di una popolazione attraverso segnali precoci di esposizione o di effetto.

In sintesi, l'utilizzo di biomarker permette, attraverso lo studio delle risposte immediate (alterazioni del DNA), di prevedere il verificarsi di effetti negativi a lungo termine (cancerogenesi, alterazioni patologiche, diminuzione delle capacità riproduttive).

Il ruolo dei biomarker in ecotossicologia non è quella di dare informazioni quantitative sui livelli di esposizione di un organismo, ma è quello di fornire indicazioni sul suo "stato di salute" come segnale potenziale di alterazioni ambientali.



EFFETTI TOSSICI DEI CONTAMINANTI

Perché una sostanza chimica possa causare un effetto sul biota è necessario che essa possa raggiungere una certa concentrazione critica all'interno dell'organismo (diffusione passiva o trasporto attivo).

La dose del tossico che si legherà al sito attivo dipenderà dalla capacità della sostanza ad essere assunta dall'organismo, a distribuirsi ed accumularsi nei tessuti, essere sottoposto ai processi di biotrasformazione e di essere eliminata.

Il sito ricevente può essere una molecola (proteine della membrana cellulare, enzima, DNA, RNA), ma anche la membrana cellulare che viene alterata nella struttura e quindi nella sua funzione.

Il bersaglio primario dei contaminanti

Quando un contaminante raggiunge un ecosistema marino, terrestre o di acqua dolce, esso può provocare una serie di alterazioni o danni a diversi livelli di complessità strutturale che, partendo dal danno biochimico e molecolare (modificazioni delle attività enzimatiche, danni sul DNA, ecc).

Gli effetti si possono riscontrare con un meccanismo a cascata, partendo da organulo, cellula, tessuto, individuo, fino a giungere al livello di popolazione e di comunità biologica.

Per es. l'effetto di un insetticida organofosforico su una popolazione aviaria si manifesta inizialmente provocando l'inibizione dell'enzima acetilcolinesterasi che mantiene la funzionalità sinaptica nel sistema nervoso. La sua alterazione (livello molecolare) si ripercuote ai livelli successivi dell'organizzazione gerarchica provocando prima malfunzionalità nel sistema nervoso centrale con conseguenti alterazioni a livelli delle caratteristiche comportamentali e riproduttive dell'individuo ed in ultima analisi causa effetti a livello della popolazione con incremento delle mortalità e riduzione delle capacità riproduttive.

Il bersaglio primario dei contaminanti

Uno degli aspetti fondamentali su cui punta la tossicologia ambientale è l'identificazione del bersaglio primario d'azione di un composto inquinante.

La tossicità primaria di un contaminante si esercita a livello biochimico e molecolare e solo successivamente gli effetti si possono riscontrare, con un meccanismo a cascata, ai livelli superiori dell'organizzazione gerarchica fino a giungere a popolazione e comunità.

Il bersaglio primario dei contaminanti

Parallelamente all'impatto negativo del tossico ai diversi livelli strutturali, si sviluppano delle risposte adattative allo stress chimico che tendono a riportare il sistema ad uno stato di omeostasi.

In particolare, le risposte **omeostatiche** a livello molecolare tendono a diminuire l'effetto tossico del composto inquinante grazie all'induzione di sistemi multienzimatici.

Questi sistemi riescono a detossificare totalmente l'organismo.

Quando il meccanismo omeostatico difensivo ad un determinato livello funzionale non è sufficiente a bilanciare l'azione del tossico, l'effetto negativo si manifesta ai livelli più alti dell'organizzazione gerarchica.

Il bersaglio primario dei contaminanti

Volendo applicare questa “ legge generale” della intercorrelabilità degli effetti di un composto inquinante nel settore delle indagini ecotossicologiche, potremmo affermare che le diverse risposte, omeostatiche e non, che un organismo genera nei confronti di un insulto chimico rappresentano dei “***potenziali marker***” di contaminazione ambientale.

Strategie per minimizzare l'impatto ambientale degli inquinanti

- Valutazione della tossicità potenziale dei composti chimici basata sulla conoscenza delle proprietà chimico-fisiche della molecola e sulla loro similarità con i composti tossici noti (**QSAR**).
- **Modelli valutativi di destino ambientale** mirati a stimare la concentrazione potenziale di un composto inquinante nei vari comparti ambientali ed a predirne la concentrazione che può causare effetti rilevabili su un organismo;
- Valutazione della **tossicità** di un composto basata su saggi di laboratorio;

Strategie per minimizzare l'impatto ambientale degli inquinanti

Studi di biomonitoraggio classico mirati alla valutazione delle concentrazioni dei contaminanti nelle componenti biotiche e abiotiche di un ecosistema, con particolare attenzione alla valutazione di fenomeni di bioconcentrazione, bioaccumulo e biomagnificazione;



Valutazione delle alterazioni sugli ecosistemi con lo studio di diversi parametri come la biodiversità, presenza o assenza di organismi bioindicatori.

5. Biomarker

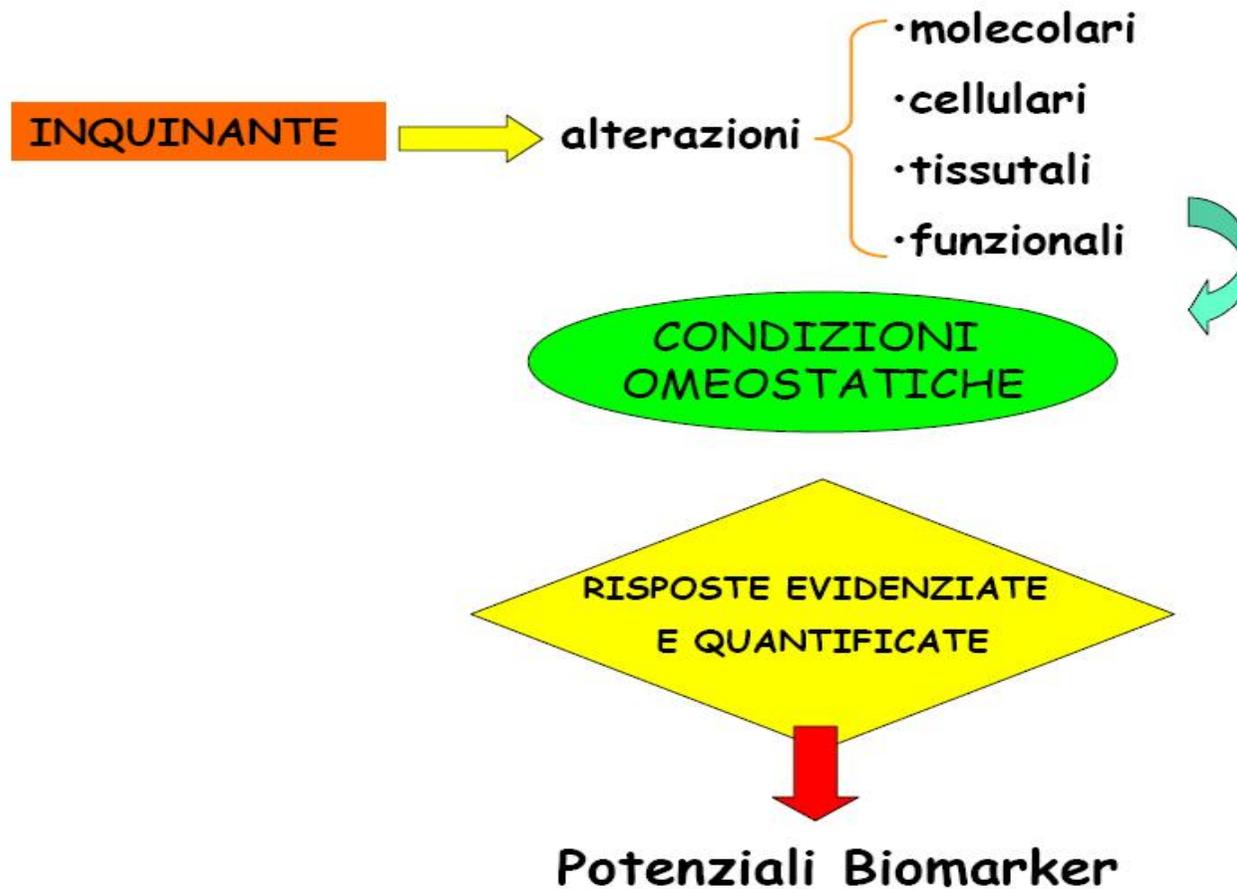
L'insieme di queste metodologie ha contribuito a raggiungere risultati importanti sulla tossicità potenziale dei composti inquinanti e sul loro destino ambientale.

Limiti

Un numero sempre maggiore di ecotossicologi si è indirizzato nella messa a punto di una nuova metodologia per la valutazione dello " **stato di salute**" di componenti importanti degli ecosistemi, puntando l'attenzione sullo studio degli "*early adverse effects*" provocato dai contaminanti e misurabili direttamente negli organismi nel loro ambiente naturale. Il tutto si basa sull'utilizzo dei biomarker.

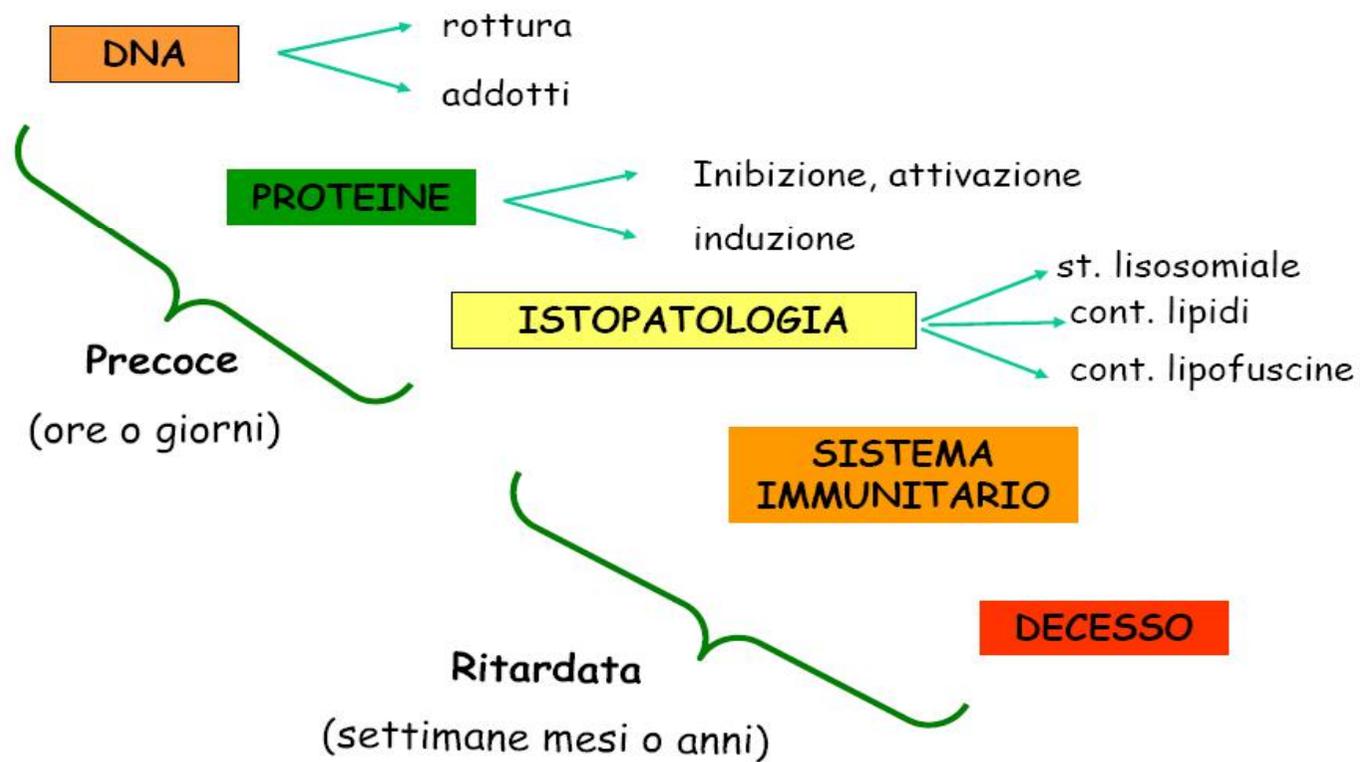


Il biomonitoraggio ambientale - PRINCIPIO DEL METODO



5. Biomarker

Il biomonitoraggio ambientale - Gerarchia della risposta dei biomarker



LE ANALISI CHIMICHE

Le analisi chimiche relative ad una lista di inquinanti chimici verificano **se nell'ambiente sono stati superati i limiti di concentrazione fissati per ogni singola sostanza.**

Il monitoraggio chimico identifica le aree e le matrici dove i contaminanti si concentrano e quindi dove è necessario intervenire.

La valutazione chimica viene affiancata al monitoraggio sul biota: bioaccumulo, stato della comunità biologica, tossicità.

VALUTAZIONE TOSSICOLOGICA

- L'analisi di integrità biologica viene effettuata a livello di comunità/ecosistema.
- Le valutazioni tossicologiche vengono condotte attraverso sperimentazione a diversi livelli di organizzazione biologica.
- La misura tossicologica, rispetto alle altre misure analitiche, **fornisce informazioni più realistiche ed affidabili sul potenziale tossico di una sostanza o di una miscela complessa**

VALUTAZIONE TOSSICOLOGICA

Risponde a tutte le sostanze presenti in un campione, in un ecosistema ed alle interazioni tra esse mentre le analisi chimiche danno informazioni solo sulle sostanze ricercate e su quelle presenti alle concentrazioni che superano i limiti consentiti dalla legge ambientale;

Ingloba il fenomeno della biodisponibilità, la presenza di un tossico non indica necessariamente un rischio per il biota;

Integra gli effetti complessivi di tutti i fattori, biotici e abiotici e delle interazioni tra essi e le sostanze chimiche;

Tiene conto della proprietà **delle sostanze di bioaccumulo** nei tessuti degli organismi.



Biomarker e Biomonitoraggio

La valutazione degli effetti degli inquinanti sulle comunità naturali è un problema di difficile risoluzione per diversi motivi:

- Esistono diverse possibili vie di assunzione nell'organismo, anche in funzione dei diversi ecosistemi;
- Gli inquinanti presentano una diversa biodisponibilità a seconda dei comparti ambientali in cui si trovano;
- Gli organismi sono generalmente esposti non ad un solo composto ma ad una miscela di sostanze che possono generare diverse interazioni biochimiche e tossicologiche (sinergismi, antagonismi);
- Esiste un periodo di latenza che può essere anche molto lungo, prima che si manifestano alterazioni a livello di popolazioni e comunità.



Biomarker e Biomonitoraggio

Spesso le analisi chimiche ambientali ed i saggi della tossicologia classica risultano inadeguati.

L'applicazione dei biomarker in situazioni ecologicamente più complesse risolve totalmente o in parte le limitazioni sopra indicate.

Vantaggi

- Forniscono una risposta integrata dell'esposizione complessiva della specie bioindicatrice, tenendo conto sia delle diverse vie di assunzione che delle esposizioni nel tempo;
- Danno una risposta integrata dell'insieme delle interazioni tossicologiche e farmacocinetiche della miscela di composti a cui è sottoposto l'organismo;
- Forniscono una risposta immediata all'esposizione al tossico (ore-giorni) che può essere impiegata per prevedere effetti a lungo termine.



Biomarker e Biomonitoraggio

L'applicazione di questo approccio metodologico deve tener conto, tuttavia, di alcuni fattori di disturbo. Ad esempio certe reazioni enzimatiche subiscono modificazioni in rapporto dell'età e del sesso dell'organismo. Però la **conoscenza** dei cicli riproduttivi del bioindicatore, delle sue caratteristiche fisiologiche, permette in parte di eliminare tali fattori di disturbo.



Categorie di Biomarker

I Biomarker vengono comunemente classificati a seconda del significato del loro segnale tossicologico:

- ***Biomarker di esposizione***, che sono le risposte di un organismo, ai diversi livelli di complessità strutturale che indicano ***l'esposizione*** ad un composto chimico ma che non forniscono alcuna indicazione dei reali effetti tossicologici sull'organismo.

- ***Biomarker di effetto***, fanno parte tutte quelle risposte che indicano sia ***l'esposizione che l'effetto*** di un composto tossico.

Categorie di Biomarker

Un esempio viene dato dall'inibizione, da parte degli insetticidi organofosforici delle *esterasi plasmatiche* che rappresentano solo un **biomarker di esposizione** perché il malfunzionamento di questi enzimi non provocano alcun effetto deleterio a livello dell'organismo; invece l'inibizione dell'*acetilcolinesterasi* rappresenta sia un biomarker di **esposizione che di effetto** perché il malfunzionamento di questo enzima provoca gravi alterazioni a livello del sistema nervoso centrale.

Biomarker specifici

Biomarker specifici, a seconda della loro specificità nei confronti di un inquinante. Fanno parte quelle risposte molecolari e biochimiche che si realizzano in un organismo a seguito dell'esposizione ad una specifica classe di contaminanti.

Un es. è dato dalla inibizione delle esterasi che rappresenta un segnale specifico di insetticidi neurotossici.

L'induzione delle metallotioneine rappresenta un indicatore di stress specifico della presenza di metalli pesanti come Cd, Hg, Zn e l'ALA-D un indicatore specifico di contaminazione da Pb.

Biomarker generali

Biomarker generali, quando le risposte dell'organismo a livello molecolare, cellulare e fisiologico, non possono essere ricondotte ad una sola classe di contaminanti, ma rappresentano lo stato generale di stress dell'organismo (certi danni sul DNA, i disordini immunitari, gli indici somatici..).

5. Biomarker

Entrambe queste famiglie di biomarker sono indispensabili nei programmi di biomonitoraggio ambientale; essi si collocano nelle due diverse fasi dell'attività conoscitiva.

I **biomarker generali**, di esposizione e di effetto, vengono applicati quando l'area oggetto di studio è sottoposta a contaminazione di origine **ignota**.

In questo caso, questi strumenti a carattere generico permettono di definire se esiste o no un rischio chimico.

Una volta definita l'esistenza di un rischio chimico, si interviene con **biomarker più specifici** per definire la classe molecolare responsabile del fenomeno di inquinamento e di definire i suoi possibili effetti tossicologici.



Strategie di impiego

CASO 1

Supponiamo che l'ecosistema oggetto di studio è sottoposto ad una miscela di composti ignoti.

L'origine e le fonti di contaminazione non sono conosciute, la durata dell'esposizione allo stress chimico non è storicamente definita.

L'utilizzo dei biomarker permette:

1. di valutare se l'ecosistema oggetto di studio è esposto o no ad uno stress chimico (biomarker generale);
2. individuare le principali classi molecolari responsabili del fenomeno di inquinamento (biomarker specifici);
3. valutare il danno potenziale causato dalla miscela di inquinanti sulla popolazione e sulla comunità in oggetto (biomarker di effetto)



Strategie di impiego

CASO 2

Sono noti:

- × La miscela di composti inquinanti a cui è sottoposto l'ecosistema, l'origine e le fonti di contaminazione e la durata dell'esposizione allo stress chimico.
- × L'impiego dei modelli previsionali **di diffusione** degli inquinanti è essenziale per individuare i principali **comparti di accumulo**, mentre l'applicazione della **chimica ambientale** risulta importante per definire i livelli di bioaccumulo dei contaminanti ai diversi livelli della catena trofica



Strategie di impiego

CASO 2

L'utilizzo dei *Biomarker* in questa situazione ambientale permette:

- × Individuare l'**effetto tossicologico** provocato dalla miscela di composti inquinanti;
- × Di valutare se le popolazioni oggetto di studio risultano **esposte o no a livelli** di contaminazione che eccedono le normali capacità di compensazione e di riparazione dell'organismo (biomarker di effetto);
- × **Valutazione del danno potenziale** causato dalla miscela di inquinanti sulla popolazione oggetto di studio.

Strategie di impiego

- × Definizione dell'area di studio contaminata e selezione di un'area di controllo non contaminata;
- × Caratterizzazione dell'area di studio (definizione dell'abbondanza delle specie, informazione sulla dinamica delle popolazioni, caratterizzazione chimico-fisica della componente abiotica);
- × Selezione di una o più specie sentinella possibilmente a diversi livelli della catena trofica;
- × Selezione dei biomarker (generali o specifici);
- × Realizzazione di un piano di campionamento (numero di campioni statisticamente sufficiente, metodi di campionamento affidabili e paragonabili nelle due aree);
- × Realizzazione delle analisi biochimiche e chimiche e descrizione delle condizioni di salute degli organismi;
- × Analisi statistica ed interpretazione dei risultati.

Metodologie ed applicazioni dei Biomarker

I biomarker vengono classificati in funzione della diversa risposta a livello gerarchico nelle seguenti categorie:

- Alterazioni del DNA
- Risposte di proteine
- Prodotti metabolici
- Variazioni a carico del sistema immunitario
- Alterazioni istopatologiche
- Biomarker non specifici e fisiologici

I principali biomarkers utilizzati per il controllo ambientale

Biomarker	Descrizione	Contaminanti	Tipo risposta
ALTERAZIONI DEL DNA			
Molti inquinanti ambientali causano danni sulla molecola del DNA, scatenando meccanismi di modificazione che si ripercuotono a cascata sul materiale genetico. Ognuna di queste modificazioni può essere utilizzata come biomarkers			
Addotti	Certe molecole genotossiche si legano stabilmente al DNA formando degli addotti che rappresentano quindi l'avvenuta esposizione ad un inquinante è difficile invece stabilire correlazioni tra in numero di addotti e lo sviluppo di fenomeni di cancerogenesi. I metodi più sensibili per l'identificazione degli addotti sono quello radiochimico (³² P-postlabeling) che utilizza per la separazione degli addotti cromatografia su strato sottile bidimensionale, e il metodo immunochimico (ELISA) che può identificare la presenza di addotti su 108 nucleotidi normali.	IPA, Diossine	Precoce
Rotture doppia elica del DNA	Può essere causata dalla formazione di addotti, le rotture sulla doppia elica possono essere valutate con metodi spettrofotofluorimetrico.	IPA, Diossine	Precoce
Aberrazioni cromosomiche; mutazioni	Sono considerati eventi irreversibili, modificazioni secondarie che si generano quando viene superata la capacità di riparo dell'organismo. Le aberrazioni cromosomiche sono valutate con test citologici come la determinazione di micronuclei, il test della cometa e l'analisi cromosomica. Le mutazioni con il metodo dell'attivazione dell'oncogene.	IPA, Diossine	Ritardata

Alterazioni DNA

Molti inquinanti ambientali, cancerogeni e mutageni, fra i quali certi IPA, clorodiossine hanno la capacità di causare danni sul materiale genetico che vanno dalle alterazioni primarie alle mutazioni genetiche; ognuna di queste modificazioni può essere quantificata e definita come biomarker:

Addotti: certe molecole genotossiche (benzopirene) si legano stabilmente al DNA formando addotti (Elisa: metodo immunochimico oradiochimico): biomarker precoce.

Modificazioni secondarie: la formazione degli addotti può causare rotture sulla doppia elica di DNA (spettrofotofluorimetrica per evidenziare il numero di rotture)

ALTERAZIONI DNA

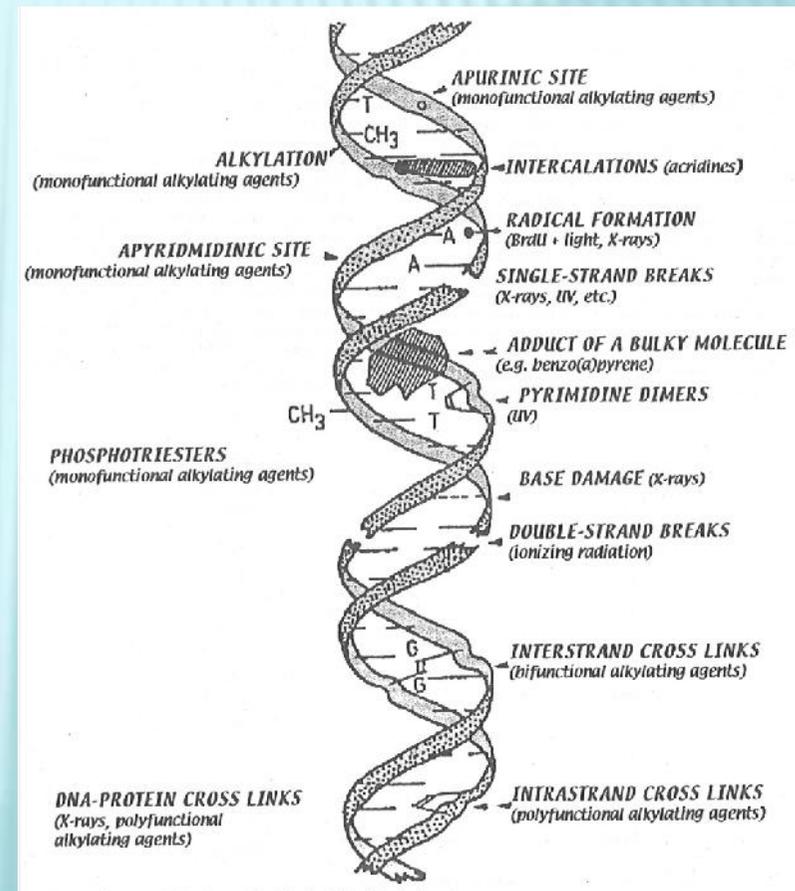
Eventi irreversibili: la generazione di modificazioni secondarie, quando eccede la capacità di riparo dell'organismo, può causare fenomeni irreversibili come le aberrazioni cromosomiche (analisi citologica come la determinazione dei micronuclei, analisi cromosomica)

Mutazioni che alterano la funzionalità del gene (attivazione dell'oncogene)

5. Biomarker

Genotossicità: danno al DNA prodotto da agenti chimici o fisici:

- radicali liberi;
- xenobiotici in grado di legare il DNA (IPA);
- metalli in grado di legarsi ai gruppi fosfati modificando il basepairing;
- UV-B



Risposte di proteine

Risposte generate in un organismo in seguito all'esposizione a contaminanti, caratterizzate dalla induzione o dalla inibizione dell'attività di proteine funzionali

Induzione attività enzimatica

- Enzimi della fase I (Monoossigenasi a funzione mista (MFO), enzimi della fase II, enzimi antiossidanti)

Inibizione attività enzimatiche

- (Esterasi), multixenobiotic resistance mechanism (MXR)

Induzione di sintesi proteica

- (Vtg, proteine da stress, metallotioneine (MT))



I principali biomarkers utilizzati per il controllo ambientale

RISPOSTE DI PROTEINE			
Sono generate in un organismo a seguito dell'esposizione a composti inquinanti, caratterizzate dalla induzione o dalla attività di proteine funzionali.			
Monoossigenasi a funzione mista.	Il sistema delle monoossigenasi a funzione mista è il principale sistema del mondo animale devoluto alla detossificazione di contaminanti ambientali di sintesi. Il nucleo funzionale del sistema è rappresentato da una emoproteina, il citocromo P450, che attraverso reazioni di ossidazione rende reattivi i composti xenobiotici liposolubili inserendo nella molecola gruppi funzionali come -OH, -SH, -COOH. Tale attivazione rende possibile l'attacco del tossico da parte di altri enzimi e la conseguente eliminazione della sostanza dall'organismo. L'induzione di tali enzimi rappresenta quindi la un segnale quali e quantitativo dell'avvenuta esposizione a sostanze tossiche xenobiotiche. Vi è poi una certa specificità degli enzimi per alcune sostanze la cui presenza in ambiente può essere asserita con precisione.	Idrocarburi aromatici polialogenati, IPA, DDTs, Aldrin, blindano.	Rapida
Metallotionine	Sono proteine citoplasmatiche a basso peso molecolare caratterizzate da una elevatissima affinità per i metalli ionici. Tali proteine si riscontrano in tutto il regno animale; la loro presenza è stata riscontrata anche nelle piante e negli organismi procarioti ed eucarioti. Tali proteine svolgono un ruolo decisivo nei processi di detossificazione da metalli pesanti.	Metalli pesanti	Rapida

I principali biomarkers utilizzati per il controllo ambientale

<i>Biomarker</i>	<i>Descrizione</i>	<i>Contaminanti</i>	<i>Tipo risposta</i>
Le esterasi	Le esterasi, si suddividono in due classi fondamentali: le esterasi di tipo "A" responsabili della detossificazione dei composti organofosforici e le esterasi di tipo "B" che sono invece inibite da tali sostanze. Il biomarker è in questi casi rappresentato dalla inibizione delle esterasi, tipicamente quelle cerebrali (acetilcolinesterasi) ed ematiche (carbossilesterasi, butirrilcolinesterasi), reazione specifica, segnale d'esposizione ed effetto alla presenza di insetticidi organofosforici e carbammati. Tali biomarkers possono essere misurati con tests enzimatici spettrofotometrici.	Organofosforici, Carbammati	Rapida.
Proteine da stress	Sono proteine "citosoliche" che aumentano marcatamente in presenza di stress di varia natura, ambientali, chimici, e fisiologici. Vengono valutate con tecniche immunochimiche o elettroforetiche.	Metalli pesanti, IPA, Idrocarburi aromatici polialogenati	Rapida
Stress ossidativo	Le risposte di tipo ossidativo che possono essere utilizzate come biomarkers si suddividono fondamentalmente in due categorie: risposte di tipo adattativo (incremento attività di enzimi antiossidanti quali superossido dismutasi, catalasi, per ossidasi e glutatione riduttasi) e risposte di tipo tossicologico (ossidazione di proteine, lipidi, ed acidi nucleici).	Stress di varia natura	Rapida

Risposte di proteine

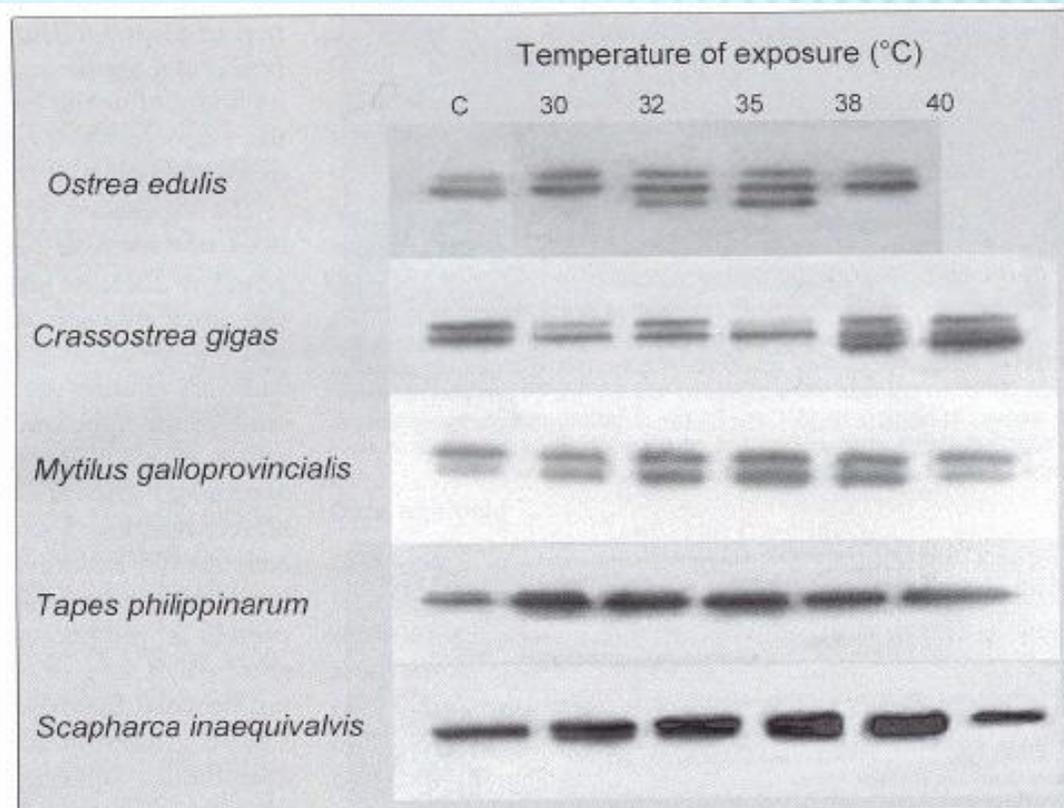
- × i meccanismi **adattativi e protettivi** coinvolti nella detossificazione di composti xenobiotici (sistema MFO, enzimi coniuganti)
- × I meccanismi di **difesa** nei confronti dei metalli pesanti: metallotioneine, che svolgono un ruolo determinante nei processi di detossificazione da metalli pesanti (Cd, Hg, Zn, Ag): metallotionine.

In funzione di queste due caratteristiche i biomarker risultano specifici dal punto di vista qualitativo e forniscono un segnale precoce della presenza di una determinata classe di contaminanti.



5. Biomarker

Fig 3. Western blotting to detect proteins of the Hsp70 family in gills of marine bivalves in control conditions (C) or exposed to different temperatures for 1 hour and allowed to recover at 18°C for 24 hours. For each bivalve species, samples from the same experiment were all blotted together. A representative immunoblot out of at least 3 separate experiments is reported. Hsp, heat shock protein.



I principali biomarkers utilizzati per il controllo ambientale

PRODOTTI METABOLICI			
Il metabolismo di alcuni composti biologici endogeni può essere alterato dalla presenza di inquinanti che provocano un accumulo anormale dei prodotti di sintesi intermedi.			
Porfirine	Il metabolismo delle porfirine può essere alterato da determinati inquinanti provocando nell'organismo e in particolare nel fegato un accumulo anomalo di prodotti intermedi. Tra i vari intermedi metabolici possono essere ricordati protoporfirine, uroporfirine, coproporfirine.	PCBs, Esaclorobenzene, metalli pesanti (Pb in particolare), - Idrocarburi aromatici polialogenati.	Media
ALAD	L'ALAD (Acido amminolevulónico deidratasi) è un importante enzima della sintesi dell'EME. La valutazione della inibizione della attività di questo enzima è stato ed è utilizzato come efficace segnale nei confronti degli inquinamenti da piombo. L'inibizione di tale enzima risulta rapidissima ma con recuperi alla normalità estremamente lunghi. L'ALAD è quindi uno dei biomarkers d'elezione nelle indagini legate alla contaminazione da piombo e metalli pesanti in genere.	-Pb e metalli pesanti in genere, Idrocarburi aromatici polialogenati	Rapida, Media

Prodotti metabolici

Certi inquinanti possono alterare il normale metabolismo di composti endogeni provocando l'accumulo di prodotti intermedi. Un es. è rappresentato dall'alterazione del metabolismo delle porfirine.

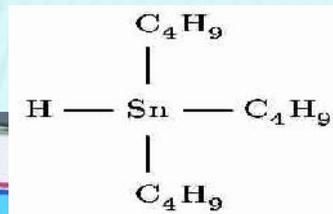
Alcuni composti come **PCB** e certi metalli come il **piombo**, alterano il metabolismo delle porfirine causando nell'organismo ed in particolare nel fegato, una produzione di prodotti intermedi, la cui concentrazione elevata, protoporfirine, uroporfirine, coproporfirine, che rappresentano un indice specifico della presenza di determinate classi di contaminanti.



I principali biomarkers utilizzati per il controllo ambientale

<p>ALTERAZIONI SISTEMA IMMUNITARIO</p> <p>Il sistema immunitario difende l'organismo da agenti patogeni; e può essere utilizzato come indicatore dello stato di salute di un organismo stressato da fattori ambientali. Tra i biomarkers immunologici maggiormente utilizzati possono essere ricordati: l'attività di fagocitosi dei macrofagi, la chemiluminescenza e l'attività citotossica dei leucociti.</p>		<p>Metalli pesanti, Idrocarburi aromatici polialogenati, IPA</p>	<p>Media Ritardata</p>
<i>Biomarker</i>	<i>Descrizione</i>	<i>Contaminanti</i>	<i>Tipo risposta</i>
<p>ALTERAZIONI ISTOPATOLOGICHE</p> <p>L'effetto tossico di molti inquinanti si traduce nel lungo periodo in alterazioni istopatologiche in organi bersaglio, e in particolare del fegato dove differenti tipi di alterazioni possono essere facilmente correlate alla presenza di contaminanti ambientali. Oltre al fegato, in particolare nei vertebrati, altri organi che possono essere oggetto di studio di biomarkers istopatologici possono essere: pelle, apparato muscolo-scheletrico, tratto gastrointestinali organi interni riproduttivi e nervosi.</p>		<p>Stress di varia natura</p>	<p>Ritardata</p>

Alterazioni morfologiche: il tributilstagno (TBT)

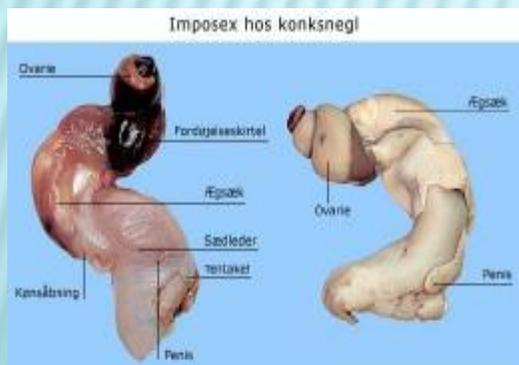


Vernici “antifouling” per navi

TBT

- biodegradazione lenta (fino a 5 mesi in condizioni aerobiche e 1-2 mesi in anaerobiosi)
- si accumula in acqua e sedimenti (Baie Porti)
- Bioaccumula

TBT altera l'equilibrio endocrino nei molluschi



Diversi studi hanno evidenziato un collegamento diretto tra esposizione a TBT e incidenza di imposex. In U.K. e Canada sono stati avviati programmi di biomonitoraggio.

TBT induce mascolinizzazione dei pesci

IMPOSEX nei molluschi (femmine che sviluppano caratteristiche maschili)

I principali biomarkers utilizzati per il controllo ambientale

Biomarker	Descrizione	Contaminanti	Tipo risposta
BIOMARKERS FISIOLÓGICI ED ASPECIFICI			
Sono utilizzati per indagini di laboratorio e monitoraggi ecotossicologici per evidenziare l'esposizione e l'effetto di composti inquinanti			
Risposte di tipo energetico	Valutazione delle riserve energetiche dell'organismo: glicogeno lipidi e proteine	Stress di varia natura	Ritardata
Risposte di tipo endocrino	Valutazioni condotte su corticosteroidi, catecolammine, ormoni steroidei, ormoni tiroidei.	Stress di varia natura	Ritardata
Biochimica del sangue	Valutazioni condotte su: enzimi ematici, glucosio, lipidi, ioni	Metalli pesanti, Idrocarburi aromatici polialogenati, IPA, Organofosforici	Media
Tassi di crescita	Concentrazione di RNA, sintesi proteica	Stress di varia natura	Ritardata
BIOMARKERS COMPORIMENTALI			
La possibilità di una relazione fra la variabilità di certe attività comportamentali (mobilità, tempo di incubazione, abitudini alimentari, aggressività, etc) e i livelli crescenti di esposizione a contaminanti ambientali è stata indagata tramite studi di laboratorio, ma per ora l'applicabilità a studi ambientali concreti presenta ancora notevoli difficoltà interpretative.		Stress di varia natura	Ritardata

Significato interpretativo

La tossicologia classica si basa sulla relazione dose-risposta; la maggior parte dei biomarker rispondono perfettamente, in condizioni controllate di laboratorio, a questa regola; pertanto possiamo ricavare una curva sperimentale dose - risposta per ciascuno dei biomarker studiati.

Tale tipo di risposta ci fornisce una informazione semiquantitativa (dose interna) che qualitativa (identità del tossico) sul contaminante.

Una situazione di questo tipo è rara in **condizioni naturali**:

1. L'organismo non è mai sottoposto all'effetto di un solo contaminante ma di una miscela di composti;
2. In condizioni naturali un enorme numero di fattori *fisico-chimici* (temperatura, salinità, ossigeno...), *ecologici e fisiologici* (stato nutrizionale, stato ormonale ...) influenzano le risposte metaboliche dell'organismo e quindi dei biomarker.

Appare evidente che in condizioni naturali non ci troviamo di fronte ad una singola relazione dose- risposta ma di fronte ad una famiglia di relazioni dose-risposta, che corrispondono alle diverse interazioni della miscela di contaminanti unitamente alle variazioni dei fattori ambientali.



Interpretazione dei dati sperimentali

L'interpretazione dei dati sperimentali si basa su un nuovo paradigma concettuale: ***the multiple-response concept*** che può essere così riassunto:

Attraverso i biomarker non otteniamo la valutazione quantitativa dei livelli del tossico a cui l'organismo è sottoposto, ma la determinazione del "livello di salute" in cui la popolazione si trova, nel suo passaggio dallo stato di omeostasi alla "malattia".

5. Biomarker

Quando un organismo è sottoposto all'effetto di un tossico si innescano una serie di meccanismi compensativi a livello biochimico e fisiologico che tendono a riportare il sistema ad uno stato di omeostasi.

Se l'esposizione perdura nel tempo, i processi compensativi diventano inefficienti ed iniziano i meccanismi di riparo. Di fronte ad un ulteriore aumento dell'esposizione, le risposte di riparo sono insufficienti; siamo in questo momento in una fase delle manifestazioni degli effetti tossici con fenomeni quali, infezioni batteriche, parassitismo, cancerogenesi e morte.

Ciascuna di queste risposte biochimiche e fisiologiche dell'organismo può essere definita come biomarker.



Significato interpretativo

Disponendo di una serie di biomarker successivi che permettono di identificare il livello in cui si trova l'individuo (omeostasi, risposte compensative, risposte di riparo, malattia), si può valutare il livello di **rischio** a cui la popolazione di appartenenza è sottoposta, fornendo informazioni sia di tipo qualitativo che semi-quantitativo.

Per completare il quadro, **si pongono tre importanti problematiche:**

- Individuare quando un individuo passa dallo stato di omeostasi alle risposte di tipo compensatorie, di riparo e quella di tipo irreversibile;
- Stabilire il legame tra le risposte a livello di individuo, popolazione, comunità;
- Definire il ruolo dei biomarker nelle azioni di bioremediation (recupero biologico di aree contaminate)



Individuazione della posizione nella curva di salute

- In primo luogo risulta fondamentale la conoscenza dei valori normali di ciascun biomarker misurato nelle diverse specie indicatrici (essenziali sono la **sensibilità e la riproducibilità** delle **metodiche adottate** e la conoscenza dei **data base** per ciascuna specie);
- La maggior parte delle risposte biologiche non hanno una distribuzione simmetrica pertanto bisogna stabilire l'intervallo di variazione dei valori di riferimento;
- Un individuo si trova in condizioni di salute quando la sua risposta cade nell'intervallo fiduciale al 95%;
- In un corretto biomonitoraggio, si utilizza una serie di biomarker: gli individui **sani** all'interno della popolazione sono quelli che hanno i valori di tutti i biomarker studiati nella norma.

Individuazione della posizione nella curva di salute

Un esempio può essere dato dall'inibizione dell'*acetilcolinesterasi* da parte degli organofosforici.

Se un organismo viene esposto a dosi crescenti di un organofosforico, risultano ben definiti tre livelli di risposta che corrispondono **a tre livelli di rischio:**

- Quando l'attività dell'enzima risulta inibita tra **lo 0 e il 20%** significa che l'organismo si trova all'interno dei livelli di omeostasi o zona di normale variazione di attività enzimatica; (**assenza di rischio**)
- Quando i livelli di inibizione si trovano fra **il 20% e il 50%** l'organismo si trova nella zona degli **effetti reversibili**;
- Quando i livelli di inibizione si trovano tra **il 50% e il 100%** l'individuo si trova nella zona degli **effetti irreversibili (elevato rischio tossicologico)**.



Effetti a livello ecologico

Uno degli aspetti più importanti delle ricerche sui biomarker è quello di individuare marcatori con elevato peso ecologico.

Questi devono essere legati a cambiamenti nella “fitness darwiniana” come alterazioni nella crescita, insuccesso riproduttivo, alterazioni nell’utilizzazione energetica.

Il ruolo fondamentale di questa metodologia dovrebbe essere quello di limitare la contaminazione a livelli che provochino risposte in una piccola parte della popolazione studiata.

Peso ecologico dei biomarker

Il rischio di un ecosistema e delle sue componenti aumenta all'aumentare dei livelli di contaminazione interna all'ecosistema.

In questa fase di “resistenza” si può assistere alla sostituzione di una **specie sensibile** con una più **resistente**, che però svolge lo stesso ruolo ecologico.

Quando però l'insulto chimico aumenta, può accadere che una o più specie chiave **scompaiono**, alterando la struttura e la funzionalità dell'ecosistema.

Peso ecologico dei biomarker

- × Esistono dei livelli di autocompensazione in tutti gli ecosistemi che tendono a preservarne l'integrità della struttura e della sua funzionalità.
- × Il concetto di resistenza degli ecosistemi è quindi molto simile al concetto di risposte compensatorie realizzate da un individuo nei confronti di un contaminante.

Relazione fra le risposte a livello dell'individuo ed effetti a livello ecologico

Se i biomarker vengono utilizzati per valutare il rischio tossicologico di una o più specie sensibili, il declino futuro di una popolazione può essere previsto (strumento prognostico) ad uno **stadio molto precoce**.

Questo concetto illustra un importante aspetto: valutare i cambiamenti a livello delle specie sensibili può rappresentare un importante strumento per la stima della salute dell'intero ecosistema.



Bioremediation

Quando un ecosistema si allontana dallo stato di omeostasi da parte di alcune specie chiave, è necessario un'azione di bioremediation.

Il ruolo dei biomarker biologici nel controllo e nella valutazione dell'efficacia dei mezzi di recupero ambientale è di fondamentale importanza.

Il ritorno verso i valori della normalità, in una serie di biomarker misurati in diverse specie chiave, può rappresentare uno strumento rapido ed efficiente per il controllo di tale azione di recupero.



Bioremediation

A questo proposito, tecniche basate sull'utilizzo di materiale biologico non distruttivo (sangue, feci, pelo) permettono di tenere sotto controllo il modificarsi di alcuni parametri biochimico-molecolari su di uno stesso individuo, durante le diverse fasi di recupero ambientale.

Il biomonitoraggio tramite biomarker

approccio classico

Il problema dell'inquinamento ambientale è stato per anni affrontato valutando il tipo, la quantità e in taluni casi la tossicità teorica dei singoli composti chimici.

difficoltà pratiche

- sorgenti di inquinamento puntiformi o diffuse e spesso discontinue
- sostanze immesse nell'ambiente spesso subiscono trasformazioni difficilmente prevedibili
- masse d'acqua sono in continuo movimento e le caratteristiche dell'ambiente repentinamente modificate
- inquinanti possono avere effetti sinergici deleteri, pur essendo presenti ciascuno a bassa concentrazione

Biomarker

definizione

alterazioni molecolari, fisiologiche o citologiche conseguenti ad uno stato di stress

biomarker specifici (alterazioni correlate in maniera specifica ad un fattore di stress)

- o Attività dell'acetilcolinesterasi (- da pesticidi)
- o Livelli di metallotioneine (+ da metalli pesanti)

biomarker generici (alterazioni non correlate in maniera specifica ad un fattore di stress)

- o Stabilità delle membrane lisosomiali
- o Accumulo di lipidi neutri
- o Accumulo di lipofuscine

Organismi sentinelle

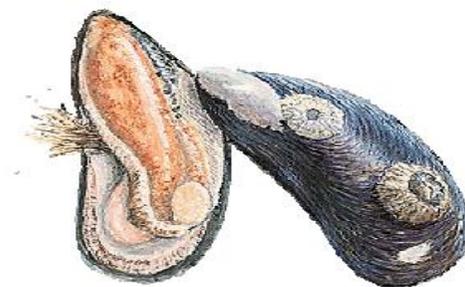
definizione

Per organismi "sentinella" si intendono tutti quegli organismi che, mediante risposte identificabili a condizioni di stress, forniscono informazioni sulla qualità dell' ambiente

caratteristiche principali

- Sensibili all'ambiente contaminato ma resistenti in ambienti di scarsa qualità
- Ampiamente diffusi e relativamente semplici da maneggiare
- Sviluppano risposte sufficientemente rapide e ripetibili
- Discreta conoscenza della fisiologia e delle risposte adattative

Organismi sentinelle



Cozze:
Mytilus galloprovincialis



Vongole:
Chamelea gallina ("poverazze")
Tapes philippinarum ("filippina")



Ostriche:
Crassostrea gigas
Ostrea edulis

5. Biomarker

procedure analitiche: progettazione della campagna

Utilizzo di organismi
RESIDENTI



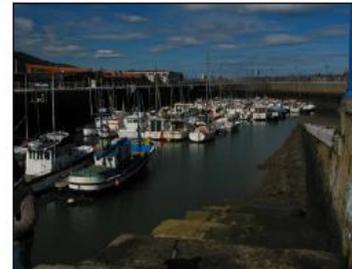
Individuazione di siti di prelievo con potenziali criticità
Individuazione di un sito di controllo negativo
Individuazione di un sito di controllo positivo



Pro
Meno difficoltà di prelievo
nessuna preparazione per il trapianto (gabbie, reti, pali ecc...)
Possibilità di monitorare temporalmente la stessa popolazione



Contro
Possibili modificazioni fisiologiche in risposta a situazioni critiche
Diversi siti=diverse popolazioni=diverse risposte



1. Prelievo di mitili in un sito fortemente contaminato (Arriluze - Bilbao)

5. Biomarker

procedure analitiche: progettazione della campagna

Utilizzo di organismi
TRAPIANTATI

Individuazione di una
popolazione in buono stato di
salute in tutti i parametri

Prelievo del pool - 1a analisi
sui tessuti (Tempo 0)

Dallo stesso pool divisione in
più gruppi da trapiantare nei
vari siti da indagare (30gg)



1. Preparazione dei pool



2. Trapianto con calza e palo

Pro

Stesse condizioni fisiologiche
degli organismi (possibilità di
confrontare le risposte nei
vari siti)

Maggiore sensibilità a
inquinamento (no
"assuefazione")

Contro

Interferenza (rumore di
fondo) nelle risposte degli
organismi provocata da
cambiamento dell'
ambiente nel momento del
trapianto



3. Trapianto con gabbia a 2 compartimenti

5. Biomarker

procedure analitiche: raccolta e preparazione degli organismi

Trasporto e dissezione degli organismi

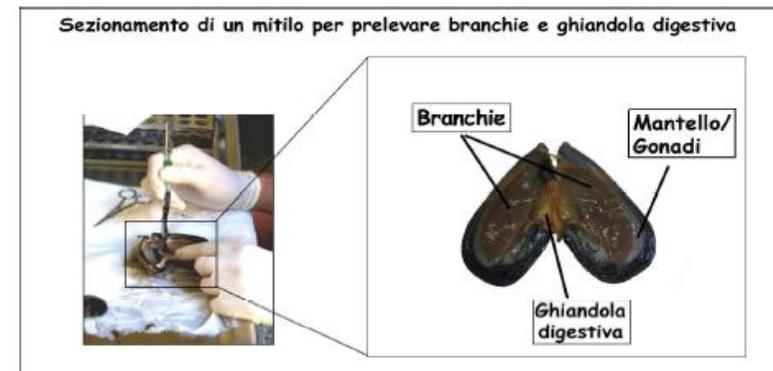
tenere in un contenitore umido e fresco e
"stressare" meno possibile

prelevare i tessuti prima possibile

lavorare sui tessuti sempre tenendoli su
ghiaccio

appena prelevati e preparati i tessuti vanno
ghiacciati e riposti a -80°C

tessuti utilizzati: **BRANCHE, GHIANDOLE
DIGESTIVE, MANTELLO/GONADI**



1. Sezionamento di *Mytilus galloprovincialis*



2. Prelievo di branchie



3. Prelievo di ghiandola digestiva



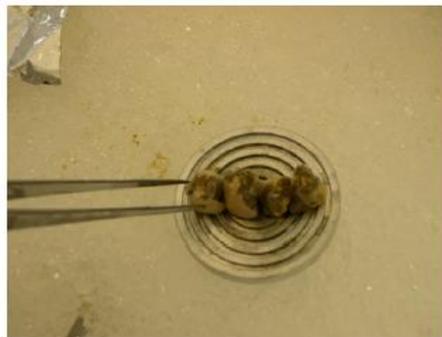
4. Congelamento dei tessuti
in azoto liquido

procedure analitiche: raccolta e preparazione degli organismi

Preparazione dei "chucks"



1. Prelievo delle ghiandole digestive



2. Posizionamento sul supporto (chuck)

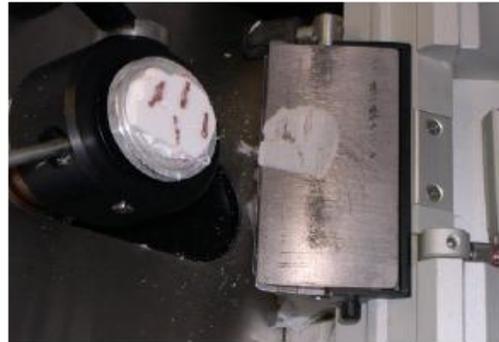


3. Immersione in esano raffreddato con azoto liquido

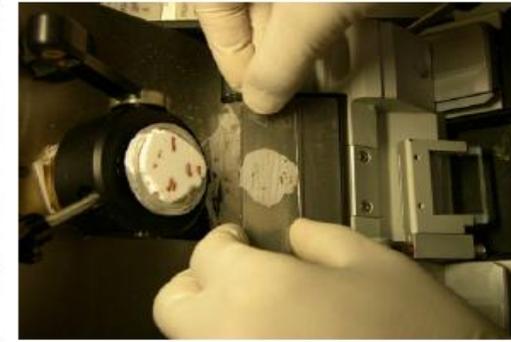
procedure analitiche: preparazione dei vetrini



a. Posizionamento nel criostato (-30°C)



b. Fettine di 10µm di spessore



c. trasferimento delle sezioni su vetrino



d. Inserimento in "hellendal" per le colorazioni



e. Esempi di colorazioni su ghiandole di mitilo



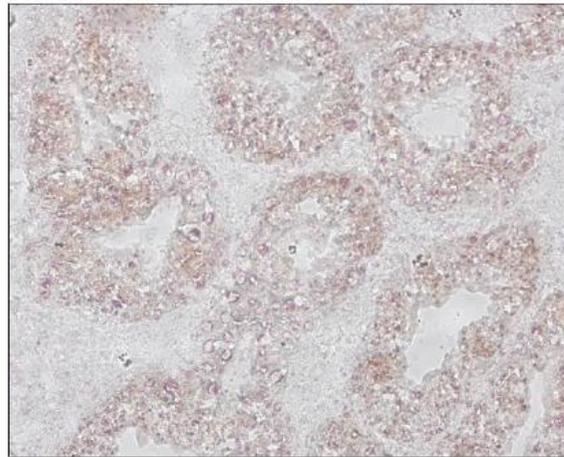
f. Rivelazione di lipofuscine nei vermi

procedure analitiche: **stabilità delle membrane lisosomiali**

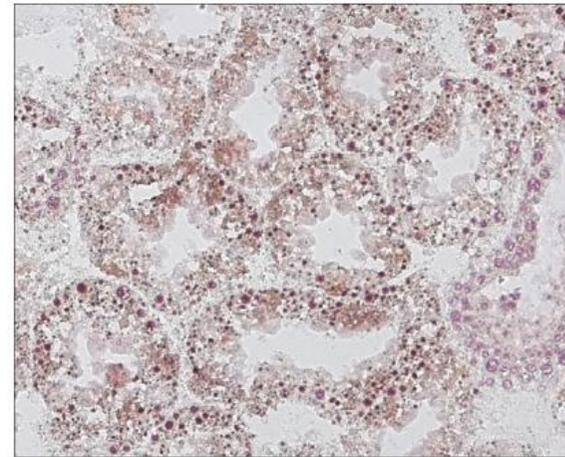
Principio del metodo

Rivelazione istochimica dell'attività dell'enzima lisosomiale *N*-acetyl- β -hexosaminidasi. Valutazione del tempo di labilizzazione della membrana lisosomiale con conseguente permeabilità al substrato (naphthol AS-BI *N*-acetyl- β -glucosaminide), reazione enzimatica rivelata con colorante (Fast Violet).

Sezioni di ghiandole digestive



a. membrana NON destabilizzata



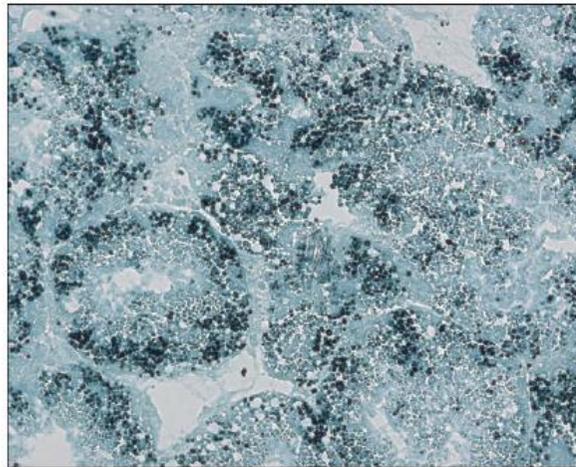
b. membrana destabilizzata

procedure analitiche: **contenuto di lipofuscine nei lisosomi**

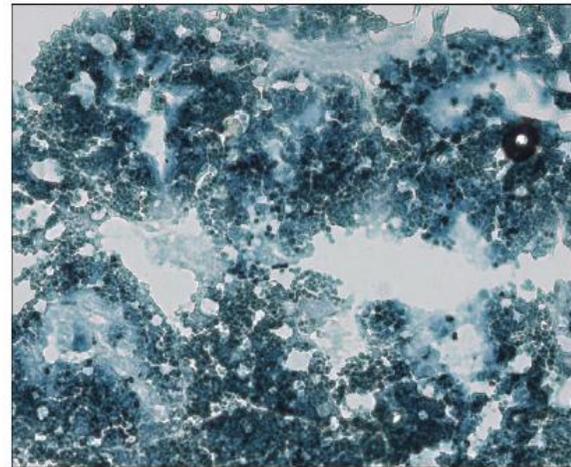
Principio del metodo

Colorazione istochimica delle lipofuscine con la reazione di Schmorl (riduzione di $\text{Fe}(\text{KCN})_6$ in presenza di FeCl_3).

Sezioni di ghiandole digestive
(in evidenza le lipofuscine colorate in verde/blu)



a. mitilo di controllo



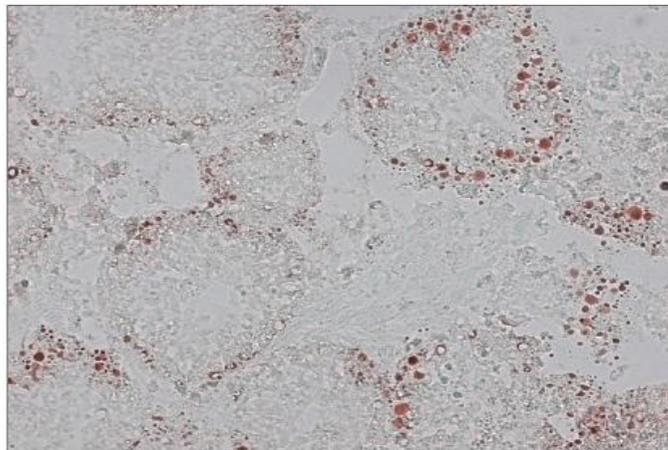
b. mitilo trapiantato

procedure analitiche: contenuto di lipidi neutri insaturi nei lisosomi

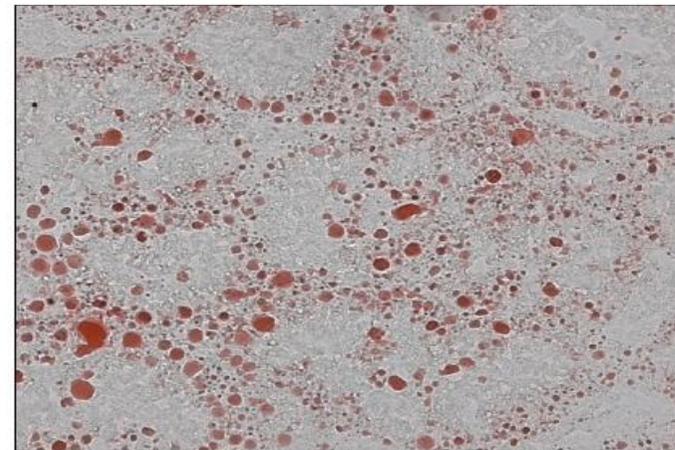
Principio del metodo

Colorazione istochimica dei lipidi con uno specifico colorante lipofilico (Oil Red O)

Sezioni di ghiandole digestive
(in evidenza i lipidi neutri insaturi in rosa)



a. mitilo di controllo



b. mitilo trapiantato

Organismi (Mytilus galloprovincialis)

- bioaccumulo di metalli
- bioaccumulo di IPA (analisi in corso)
- batteria di biomarker

stabilità della membrana lisosomiale

accumulo di lipidi neutri insaturi

accumulo di lipofuscine

espressione delle hsp70

attività dell' acetilcolinesterasi

contenuto di metallotioneine