

2 Biomarker

2.1 Il concetto di biomarker

Negli anni Ottanta, si è iniziato a porre l'attenzione sui possibili effetti che i contaminanti ambientali provocano sugli organismi, ai vari livelli dell'organizzazione gerarchica, dalla molecola alla comunità.

Ogni organismo vivente, animale o vegetale, che campionato in un determinato ambiente fornisce indicazioni sul livello di contaminazione di quella determinata area si definisce “Organismo sentinella”.

I Biomarker o indici di stress, possono essere definiti come alterazioni, indotte da un contaminante, a livello di componenti molecolari o cellulari, di una struttura o di una funzione, che possono essere evidenziate e quantificate in un organismo sentinella.

Quando un composto tossico penetra in un ecosistema, sia questo marino, terrestre o d'acqua dolce, esso può provocare una serie d'alterazioni o danni a diversi livelli di complessità strutturale che vanno dal danno molecolare, fino a giungere ad alterazioni al livello d'organismi, popolazioni o comunità (Stebbing, 1985).

L'attenzione è puntata sull'identificazione del bersaglio primario dell'azione di un composto inquinante. La tossicità primaria di un contaminante si esercita, in linea generale, a livello molecolare, determinando modificazioni delle attività enzimatiche, alterazioni a livello DNA, ecc.; successivamente gli effetti si possono rilevare, con un meccanismo a cascata, ai livelli successivi dell'organizzazione gerarchica, organello, cellula, tessuto, organo ed organismo fino a giungere al livello di popolazione.

Simultaneamente all'impatto negativo dell'inquinante, si sviluppano da parte dell'organismo delle risposte adattative allo stress chimico che mirano a riportare ad uno stato d'omeostasi. In particolare le risposte omeostatiche a livello primario tendono a diminuire l'effetto tossico del composto inquinante

tramite l'attivazione di sistemi multienzimatici come le monoossigenasi a funzione mista e gli enzimi coniugati, o le metallotioneine. Questi sistemi enzimatici riescono a detossificare totalmente o in parte l'organismo.

Le diverse risposte che l'organismo realizza nei confronti dell'insulto chimico rappresentano quindi dei “potenziali biomarker” utilizzabili in programmi di monitoraggio ambientale (Bayne et al., 1986). L'utilizzo di biomarker permette, attraverso lo studio delle risposte immediate, di prevedere il manifestarsi d'effetti negativi a lungo termine come cancerogenesi, alterazioni patologiche, diminuzione delle capacità riproduttive, e mortalità nell'ambito di una popolazione.

2.2 L'interpretazione dei biomarker

Gli organismi residenti in un ambiente inquinato, non sono mai sottoposti all'effetto di un solo composto tossico, ma ad una miscela di composti, che interagiscono attivamente tra loro provocando nell'individuo una risposta cumulativa o sinergica.

Oltre a fattori antropici l'organismo subisce condizionamento anche da parte di molti fattori naturali chimico-fisici (temperatura, salinità, ossigeno, ecc.), ecologici e fisiologici (stato nutrizionale, stato ormonale, età, ecc.) che influenzano in maniera notevole le risposte metaboliche dell'organismo e di conseguenza i biomarker.

Appare evidente che in natura non ci troviamo di fronte ad una singola reazione dose-effetto, ma di fronte una “famiglia” di reazioni dose-effetto, che corrispondono alle diverse interazioni della miscela di contaminanti con gli stress ambientali (McCarthy et al., 1990).

Quindi l'interpretazione dei biomarker si basa su un nuovo paradigma concettuale che può essere così riassunto: utilizzando i biomarker non otteniamo la valutazione quantitativa dei livelli del composto tossico cui l'organismo è sottoposto, ma la determinazione del “livello di salute” in cui l'organismo si trova, nel suo passaggio dallo stato d'omeostasi alla malattia (McCarthy & Shugart, 1990; McCarthy et al., 1990).

Quando un organismo è sottoposto all'effetto di composti tossici, s'innescano una serie di meccanismi protettivi a livello biochimico e fisiologico che tendono a riportare il sistema ad uno stato d'omeostasi; se l'esposizione continua o aumenta i processi compensativi diventano inefficienti ed iniziano i processi di riparo. Quando i meccanismi di riparo non sono più sufficienti, siamo nella fase di manifestazioni visibile degli effetti tossici, con fenomeni d'infezioni batteriche, parassitismo, cancerogenesi e morte (Depledge, 1989).

Potendo utilizzare una serie di biomarker aventi successivi tempi di risposta, che permettono di identificare il livello in cui si trova la popolazione (omeostasi, risposte compensative, risposte di riparo, malattia), si può fare una valutazione del “livello di rischio” cui la popolazione è sottoposta.

2.2.1 Vantaggi dei biomarker

La valutazione degli effetti della contaminazione di una comunità che popola un ecosistema è un problema di difficile risoluzione per diversi motivi tra i quali vanno annoverati i seguenti (McCarthy et al., 1990):

- esistono diverse possibili vie d'assunzione dei composti inquinanti nell'organismo;
- i contaminanti presentano una diversa biodisponibilità secondo i comparti ambientali in cui si trovano;
- gli individui sono in genere sottoposti ad una miscela di contaminanti; tali sostanze possono generare diverse interazioni biochimiche e tossicologiche tra loro;
- esiste un periodo di latenza in genere molto lungo prima che si manifestino alterazioni a livello di popolazioni e comunità.

Il principio che si trova alla base della bioindicazione è la possibilità di ottenere informazioni sui composti inquinanti a valle dei loro processi cioè direttamente sui recettori biologici, saltando i passaggi relativi ai composti abiotici, e commisurare l'impatto in relazione alla risposta biologica.

Il biomonitoraggio mediante l'utilizzo dei biomarker fornisce informazioni addizionali a quelle ricavate dal monitoraggio chimico o

tossicologico. Le analisi di chimica ambientale in molti casi non sono complete per studi sulla qualità ambientale, poiché forniscono informazioni precise ed accurate dal punto di vista quantitativo e qualitativo sulla distribuzione degli inquinanti nei vari comparti, ma non prevedono l'effetto che la sommatoria di questi contaminanti esercita sull'organismo. Dato il sempre crescente numero d'inquinanti e la variabilità cui esse vanno incontro soprattutto in ambiente marino, tali analisi si presentano inoltre estremamente dispendiose in termini d'uomini e di mezzi (McCarthy et al., 1990).

Parte di tali problemi possono essere risolti con l'utilizzo di biomarker in organismi sentinella (McCarthy & Shugart, 1990; McCarthy et al., 1990):

- forniscono una risposta integrata dell'esposizione complessiva della specie sentinella ai composti tossici, considerando sia la sommatoria delle diverse vie d'assunzione che l'esposizione nel tempo entro un determinato intervallo spaziale;
- forniscono una risposta immediata all'esposizione alle sostanze tossiche; questo permette di prevedere l'effetto negativo a lungo termine.

2.2.2 Limiti o fattori di disturbo

Esistono anche fattori naturali che influiscono sullo stato fisiologico dell'organismo e quindi alterano in una certa maniera il segnale fornito dagli indici di stress. Questi fattori di disturbo come lo stato ormonale, l'età ed il sesso dell'organismo (Fossi et al., 1990) possono influire sulle reazioni multienzimatiche, ad esempio il sistema delle monoossigenasi a funzione mista, oppure sulla produzione di metallotioneine. Si osserva che nelle femmine durante la maturità sessuale si riscontrano alte concentrazioni di tioneine dello Zn a livello epatico, e l'induzione stessa delle MT può variare tra maschi e femmine (Viarengo et al., 1997).

L'influenza dei fattori di disturbo può essere minimizzata tramite una conoscenza approfondita dei cicli riproduttivi dell'organismo sentinella, delle sue caratteristiche fisiologiche e con un adeguato programma di campionamento, che copra le principali stagioni.

Inoltre nei programmi di biomonitoraggio viene sempre analizzata una “batteria” di biomarker, comprendente un numero medio di 8-10 parametri. Questo fa sì che la diagnosi sulla salute dell’ambiente in esame sia stilata sulla base dell’alterazione di più parametri contemporaneamente, e non di uno solo, che potrebbe risultare ingannevole.

2.3 Classificazione dei biomarker

Suddividere i biomarker attualmente disponibili in categorie non è semplice; infatti, i parametri discriminanti possono essere differenti, ne individuiamo solo alcuni.

2.3.1 Interazione tra organismo e contaminante

Una prima suddivisione può interessare i livelli crescenti d’interazione tra il contaminante e l’organismo sentinella (Fossi et al., 1992):

- *biomarker d’esposizione*: segnalano risposte relative alla prima interazione tra la molecola (inquinante) ed il recettore biologico. Tramite quest’indice si individua l’avvenuta esposizione al contaminante. Per questo scopo possono essere utilizzati indici di stress quali le attività enzimatiche delle monoossigenasi a funzione miste (MFO), oppure le metallotioneine (vedi cap. 5) come segnalatori d’esposizione ai composti organoclorurati ed ai metalli pesanti, l’inibizione dell’acetilcolinesterasi a seguito d’esposizione ad insetticidi organofosforici e carbammati o la quantificazione degli addotti del DNA derivanti da idrocarburi policiclici aromatici (IPA) (Fossi et al., 1992);
- *biomarker d’effetto*: segnalano come un organismo, una popolazione o una comunità siano soggette ad effetti tossicologici da parte di uno o più inquinanti.

2.3.2 Specificità della risposta

I biomarker possono essere divisi anche in funzione della loro “specificità” di risposta nei confronti d’agenti inquinanti (Bayne, 1986; Moore, 1985) in:

- *biomarker specifici*: quelle risposte molecolari e biochimiche che si manifestano in un organismo come risposta ad una specifica classe di contaminanti (ad esempio metallotioneine in risposta all'inquinamento da metalli). In questo caso la risposta di difesa è estremamente specifica e indica chiaramente la classe di sostanze responsabile della contaminazione.
- *biomarker generali*: quelle risposte dell'organismo a livello molecolare, cellulare e fisiologico, che non possono essere ricondotte ad una specifica classe d'inquinanti, ma rappresentano lo stato generale di stress dell'organismo (certi danni al DNA, i disordini immunitari, gli indici somatici, la stabilità della membrana lisosomiale ecc..).

2.4 I biomarker come strumento di diagnosi

Nel biomonitoraggio con l'utilizzo di una batteria di biomarker possiamo diagnosticare la presenza di particolari inquinanti con i biomarker specifici, o semplicemente uno stato di sofferenza degli organismi attraverso i biomarker generali. Esistono tre livelli gerarchici in cui possono essere applicati i biomarker nei programmi di biomonitoraggio (McCarthy & Shugart, 1990):

1. il primo stadio è *l'identificazione del pericolo*, tale approccio è applicato quando non si conosce la composizione della miscela contaminante. L'individuazione del pericolo è diagnosticata con l'utilizzo dei biomarker generali, la risposta che se ne ricava è la presenza o assenza di un rischio chimico;
2. il secondo stadio è *la valutazione del pericolo*, che si attua quando conosciamo a priori i potenziali inquinanti. In questa fase l'utilizzo dei biomarker specifici ci consente di identificare le classi dei contaminanti presenti, l'estensione e la gravità dell'area di contaminazione;

3. l'ultimo stadio è *la previsione del rischio*, dove le risposte dei biomarker possono dare indicazioni sulle potenziali conseguenze negative a lungo termine a livello di popolazione e di comunità.

Biomarker	Contaminante	Informazione
Alterazioni DNA	Metalli pesanti, composti organici	S, D, P
Esterasi ematiche	Organofosforici, Carbammati	S, D, P
Metallotioneine	Metalli pesanti	S,D
MFO	Organofosforici, DDT, PCBs,	S, D
Risposte immunitarie	Metalli pesanti, composti organici	S

Tabella 2.1: Risposta interpretativa dei vari biomarker (Shugart et al., 1990) dove:
 S: Segnale di problema potenziale
 D: Indicatore definitivo di una classe di contaminanti
 P: Indicatore predittivo di un effetto negativo a lungo termine

2.5 Principali biomarker

Una classificazione generale dei biomarker, intesi come alterazione della fisiologia dell'organismo, distingue le seguenti categorie (McCarthy et al., 1990):

- alterazioni del DNA;
- risposte in termini d'induzione/inibizione della sintesi di proteine.
- alterazioni del sistema immunitario;
- alterazioni istopatologiche;

2.5.1 Alterazioni del DNA a diversi livelli

Molti inquinanti ambientali cancerogeni e mutageni, quali gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e le diossine, possono danneggiare il DNA in vario modo, causando la rottura della doppia elica, la frammentazioni dei cromosomi, mutazioni. Ognuna di queste alterazioni può essere quantificata ed utilizzata come biomarker (Shugart, 1990).

- *Formazione degli addotti*: si originano quando certe molecole genotossiche formano legami stabili con il DNA. Questo tipo di risposta è identificata con in metodo immunochimico (ELISA) e con tecniche radiochimiche (32 P-Postlabeling).
- *Modificazioni secondarie*: sono rappresentate dalla rottura della doppia elica, causata dalla formazione degli addotti. Questa tecnica è investigata con il metodo dell'”Alcaline Unwinding” che è una valutazione quantitativa spettrofotometrica.
- *Eventi irreversibili*: si manifestano quando la capacità di riparo dell'organismo è superata dall'effetto dell'inquinante. Sono un esempio le aberrazioni cromosomiche. La quantificazione avviene tramite test citologici.
- *Mutazioni*: rappresentano l'evento ultimo d'alterazione del DNA, sono modificazioni che vanno ad incidere sulla funzionalità del gene.

2.5.2 Proteine come risposte

In questa categoria di biomarker ricadono tutte quelle proteine funzionali che possono essere indotte o inibite dalla presenza di contaminanti (McCarthy & Shugart, 1990):

2.5.2.1 Proteine inducibili:

In questa suddivisione troviamo meccanismi adattativi e protettivi coinvolti nella detossificazione da composti xenobiotici e metalli pesanti quali:

- *Sistema delle monoossigenasi a funzione mista (MFO)*:
ha la funzione di ossidare i composti organici lipofili anche d'origine xenobiotica (idrocarburi aromatici, pesticidi, ecc..), per renderli più solubili e più facilmente eliminabili.
Questo sistema multienzimatico è “substrato-inducibile” e “substrato-specifica” ossia la presenza di sostanze xenobiotiche induce la sintesi di nuove proteine funzionali in una quantità proporzionale alla concentrazione dell'inquinante. Possiamo quindi estrapolare informazioni sia di tipo qualitativo sia di tipo semi-quantitativo.
- *Metallotioneine*: sono proteine citoplasmatiche, che hanno la capacità di legare stabilmente metalli essenziali Cu e Zn ma anche metalli estremamente tossici come Cd e Hg riducendone gli effetti. Esse sono substrato-inducibili e quindi rappresentano un biomarker specifico per i metalli pesanti (Viarengo, 1990) (vedi cap. 5).
- *Proteine da shock termico (HSP)*: sono proteine citoplasmatiche, che svolgono un ruolo molto importante nel ripiegamento delle proteine cellulari. È dimostrato che la risposta "heat shock" è un evento comune a tutti gli organismi (animali e vegetali), caratterizzato dall'aumentata sintesi delle proteine hsp in risposta ad un numero molto elevato di stimoli endogeni (febbre, infiammazione, ischemia, carenza di glucosio, ma anche differenziamento, cancerogenesi, invecchiamento) ed ambientali,

naturali e non (aumento di temperatura, ipossia, shock osmotico, variazione di pH, metalli pesanti, etanolo, policlorobifenili, perossido di idrogeno, tossine metaboliche, etc) (vedi cap. 4).

2.5.2.2 Proteine inibite:

Di questa categoria fanno parte le attività enzimatiche come l'esterasi ematiche e cerebrali che sono bloccate da insetticidi organofosforici. Nella famiglia dell'esterasi troviamo due classi fondamentali: l'esterasi A destinate alla detossificazione da organofosforici e l'esterasi B che invece sono inibite.

Le esterasi β cerebrali (acetilcolinesterasi) ed ematiche (butirilcolinesterasi, carbossiesterasi) rappresentano uno strumento valido per la valutazione del rischio connesso all'utilizzo degli insetticidi.

L'inibizione è stimata comunemente con test enzimatici spettrofotometrici.

2.5.3 Alterazioni sistema immunitario

Il sistema immunitario ha la capacità di distruggere elementi estranei e difendere l'organismo da agenti patogeni. L'utilizzo delle risposte immunitarie come biomarker è un buon indice dello stato di salute dell'organismo. Un aumento nel sangue di cellule con la funzione di difesa o d'anticorpi, oppure l'attivazione di riposte citotossiche negli emociti, rappresenta uno stato di salute alterato.

2.5.4 Alterazioni istopatologiche

In conseguenza del loro effetto tossico, molti composti inquinanti provocano alterazioni istopatologiche in organi bersaglio, in particolare, nel fegato nei vertebrati e nella ghiandola digestiva nei molluschi. L'utilizzo di tecniche istochimiche rappresenta quindi un ottimo strumento per valutare la risposta ad effetti acuti e cronici indotti da inquinanti.

2.5.4.1 Stabilità delle membrane lisosomiale

I lisosomi sono organuli citoplasmatici circondati da una propria membrana contenenti enzimi idrolitici che servono alla cellula per la digestione

di macromolecole. Gli enzimi lisosomiali sono in grado di idrolizzare proteine, polisaccaridi, grassi, acidi nucleici. Essi lavorano in ambiente acido, ad un pH ottimale 5. La membrana lisosomiale riesce a mantenere bassi livelli di pH interno pompando ioni idrogeno dal citosol verso l'interno del lume del lisosoma. Un'altra funzione chiave dei lisosomi è il riciclaggio delle sostanze organiche cellulari, un processo denominato autofagia che si verifica quando un lisosoma ingloba un altro organulo o una piccola parte del citosol (Campbell, 1995). Molto importante è il ruolo dei lisosomi negli organismi acquatici in relazione alla regolazione dell'osmolarità e del volume cellulare ottenuta attraverso il catabolismo proteico e il controllo della concentrazione citosolica degli amminoacidi. Proprio per i compiti assolti i lisosomi entrano in contatto con le sostanze xenobiotiche, le quali inducono alterazioni alle membrane lisosomiali causando la loro destabilizzazione.

Recenti studi hanno mostrato un significativo aumento del volume dei lisosomi nei mitili (*Mytilus edulis*) e nella chiocciola (*Liottorina littorea*) in risposta a idrocarburi (Lowe et al., 1981). L'aumento del volume lisosomiale è stato associato alla destabilizzazione delle membrane o all'incremento della permeabilità delle stesse (Moore, 1976; Baccino, 1978).

2.5.4.2 Accumulo di lipidi neutri nei lisosomi

Altre alterazioni, indotte dagli idrocarburi, in particolare quelli aromatici, sono l'accumulo di lipidi neutri insaturi all'interno dei lisosomi. Tale alterazione del metabolismo è in genere correlata ad una alterazione dello stato redox cellulare, e può essere messa in evidenza con una opportuna colorazione.

2.5.4.3 Accumulo di lipofuscine nei lisosomi

L'alterazione dello stato redox dei lisosomi è segnalato dall'accumulo di lipofuscine. Quest'ultime sono pigmenti di derivazione lipidica presenti all'interno dei lisosomi, che si originano dall'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi di cui sono ricchi i tessuti. L'accumulo di lipofuscine può essere correlato ad una alterazione dello stato redox cellulare può essere messo in evidenza con opportune analisi citochimiche quantitative che permettono di stimare il livello di alterazione dell'attività lisosomiale.