

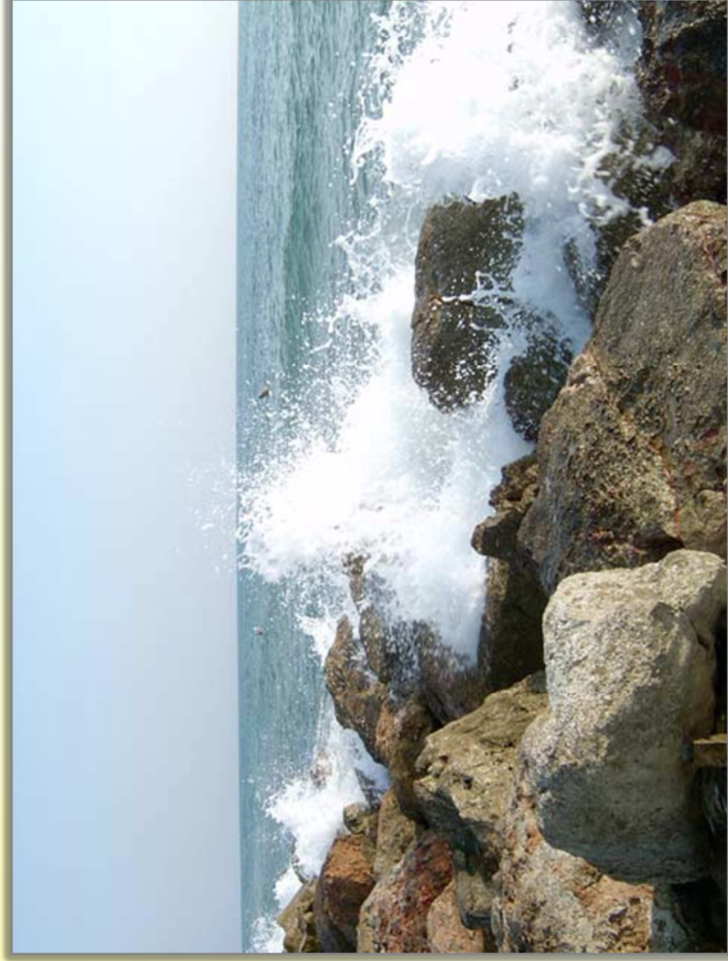


Istituto Zooprofilattico  
Sperimentale delle  
Regioni Lazio e Toscana



*Il controllo dei molluschi bivalvi*

# I BIOMARKERS



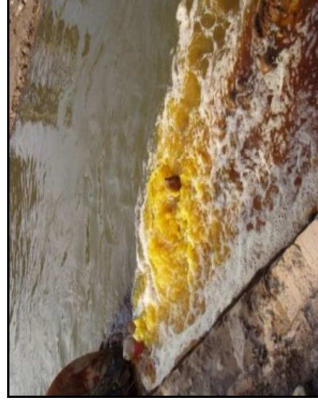
**Enrica Ricci**

# I BIOMARKERS ..... Breve storia (1)

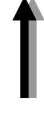
Attività antropiche



Inquinamento ecosistema marino costiero

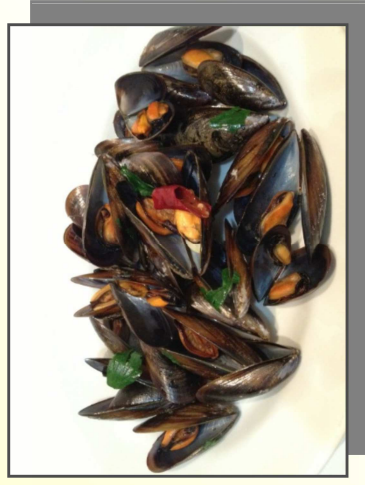


Effetti dei contaminati chimici sugli organismi viventi

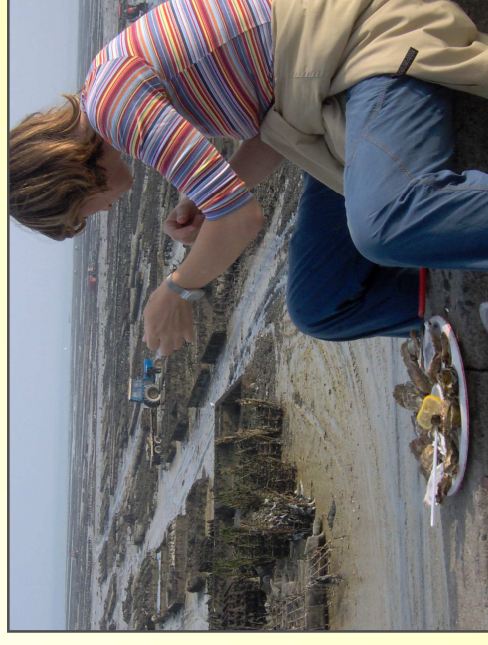


Bioaccumulo

Biomagnificazione



Uomo  
Grande consumatore di  
prodotti della pesca





# I BIOMARKERS ..... Breve storia (2)

## **REGOLAMENTO (CE) n. 315/93 e successive modifiche**

Stabilisce procedure comunitarie relative ai contaminanti nei prodotti alimentari

## **REGOLAMENTO (CE) n. 1881/2006**

Definisce i tenori massimi ammissibili di nitrato, micotossine, metalli, diossine, idrocarburi policiclici aromatici ecc. presenti nei prodotti alimentari.

## **“Limiti” dell’analisi chimica**

- ✓ Ristretta solo ad un numero limitato di parametri;
- ✓ Le sostanze inquinanti immesse nell’ambiente vanno incontro a diverse trasformazioni chimiche difficilmente rilevabili;
- ✓ Le masse d'acqua sono in continuo movimento e le caratteristiche dell'ambiente in esame sono repentinamente modificate;
- ✓ Gli inquinanti possono avere effetti sinergici deleteri per gli organismi viventi pur essendo presenti ciascuno a bassa concentrazione.



## **Biomarkers**

# I BIOMARKERS

## Definizione

“..... 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)**





# I BIOMARKERS ..... Classificazione (1)

**Interazione tra organismo e contaminante** (Fossi, 2000)

## **Biomarker di esposizione**

« ..... tutte quelle risposte di un organismo che indicano l'esposizione ad un composto chimico o ad una classe di composti chimici ma che non forniscono nessuna indicazione sui reali effetti tossicologici sull'organismo»

***Metallotioneine*** (metalli pesanti)

***Inibizione dell'acetilcolinesterasi*** (insetticidi organofosforici e carbammati)

***Addotti del DNA*** (idrocarburi policiclici aromatici)

## **Biomarker di effetto**

« .... tutte quelle risposte che indicano sia l'esposizione ad un composto tossico che il suo effetto tossicologico»

***Inibizione dell'acetilcolinesterasi***  
(insetticidi organofosforici e carbammati)

# I BIOMARKERS ..... Classificazione (2)

**Specificità della risposta** (Fossi, 2000)

## **Biomarker specifici**

« .... quelle risposte molecolari e biochimiche che si manifestano in un organismo a seguito dell'esposizione ad una specifica classe di contaminanti»

***Metallotioneine*** (metalli pesanti)

***Inibizione dell'acetilcolinesterasi*** (insetticidi organofosforici e carbammati)

***Sistema delle monoossigenasi a funzione mista***

(composti xenobiotici liposolubili)

## **Biomarker generali**

« ..... quelle risposte dell'organismo a livello molecolare, cellulare e fisiologico, che non possono essere direttamente ricondotte ad una sola classe di contaminanti, ma che indicano lo stato generale di stress dell'organismo»

***Danni al DNA, disordini immunitari,  
stabilità delle membrane lisosomiali***



# I BIOMARKERS .....

..... **come strumento di diagnosi**

**Batteria di biomarkers**



**Identificazione del pericolo**

Biomarkers generali  
Presenza o assenza di uno stato di sofferenza

**Valutazione del pericolo**

Biomarkers specifici  
Presenza di determinati contaminanti  
Estensione e gravità dell'area di contaminazione

**Previsione del rischio**

Risposte dei biomarkers possono dare indicazioni sulle potenziali conseguenze negative a lungo termine a livello di popolazione e di comunità

# **I BIOMARKERS ..... le nostre procedure**

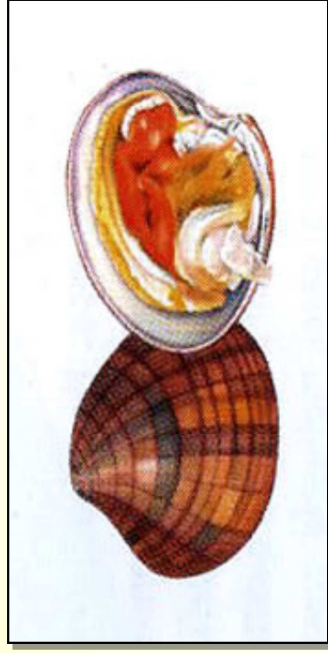
**POS SIP 14 INT « Attività dell'acetilcolinesterasi»**

**POS SIP 15 INT « Frequenza dei micronuclei»**

**POS SIP 16 INT « Tempo di ritenzione del rosso neutro»**

**POS SIP 17 INT « Stabilità delle membrane lisosomiali»**

**POS SIP 18 INT « Proteine totali (Metodo di Bradford)»**





# STABILITA' MEMBRANE LISOSOMIALI (1)

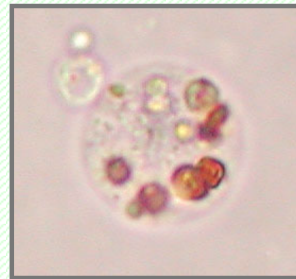
POS SIP 017 INT

Lisosomi → ruolo importante nei processi di detossificazione

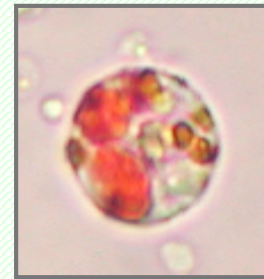
I **contaminanti chimici** inducono alterazioni nelle **membrane lisosomiali** causando la loro **destabilizzazione**.

La stabilità delle membrane lisosomiali è un **indice** dello **stato funzionale delle cellule di un organismo**.

Viene valutata mediante **colorazione** delle **cellule** con il colorante **rosso neutro**.



Cellula stabile



Cellula instabile

# STABILITA' MEMBRANE LISOSOMIALI (2)

POS SIP 017 INT

**Ringwood et al., 2003.** Cellular Biomarkers (Lysosomal Destabilization, Glutathione & Lipid Peroxidation) in Three Common Estuarine Species: A Methods Handbook.



## Il campione deve

- Pervenire in laboratorio a T refrigerata
- Essere conservato a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Processato entro 24h dal prelievo

**Per ogni campione analizzare 6-10 soggetti di dimensione omogenea.**



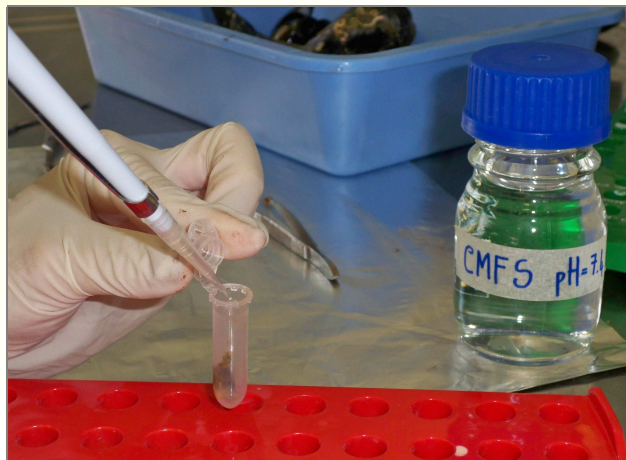
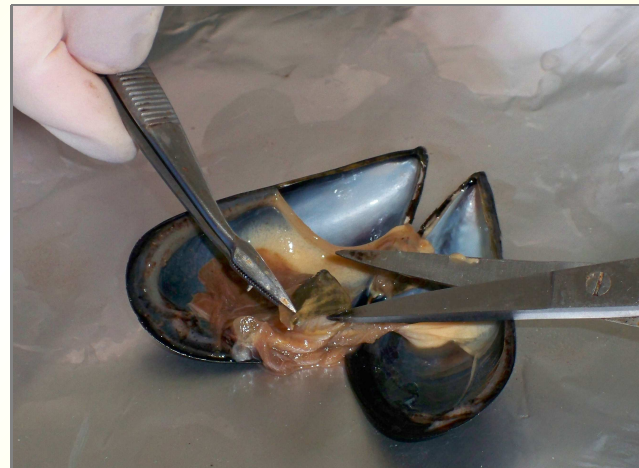
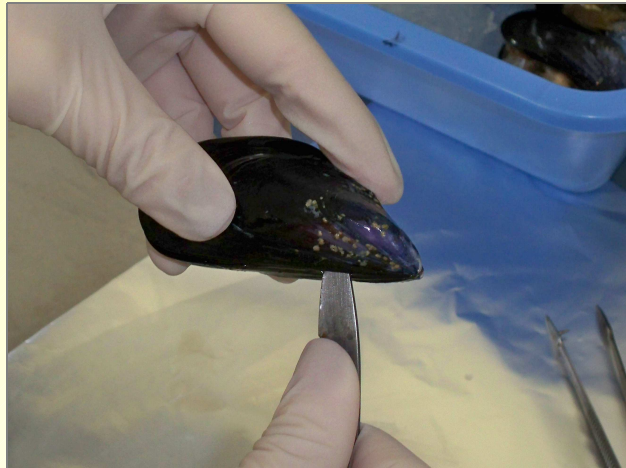


# STABILITA' MEMBRANE LISOSOMIALI (3)

POS SIP 017 INT

**Per ogni soggetto** operare come segue:

**1. Prelevare, sminuzzare e lavare l'epatopancreas** due volte utilizzando una soluzione salina pH= 7,4. Centrifugare a 200g per 5 minuti a 4°C.

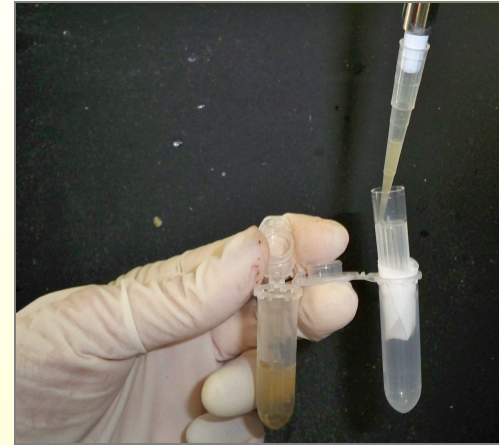
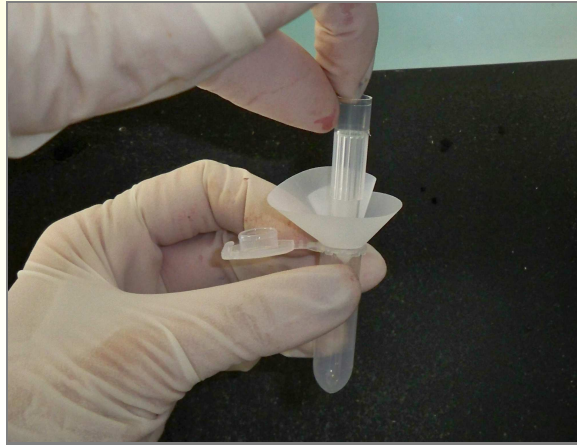
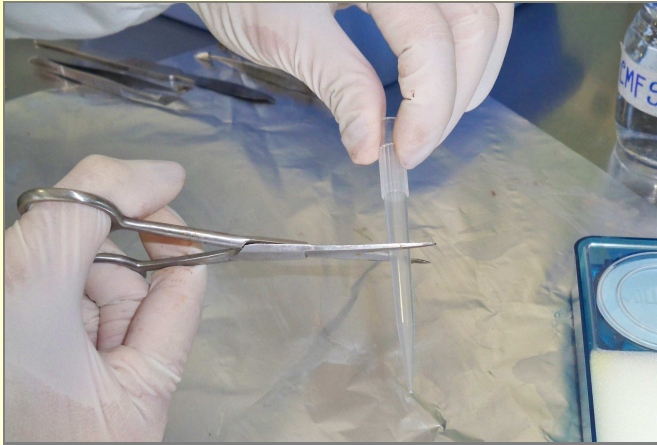


# STABILITA' MEMBRANE LISOSOMIALI (4)

POS SIP 017 INT

**2.** Recuperare il pellet e **digerire il campione con tripsina** (1 mg/ml) a T ambiente per 10 minuti.

**3. Filtrare il campione** per eliminare il tessuto non digerito. Centrifugare a 200g per 5 minuti a 4°C.



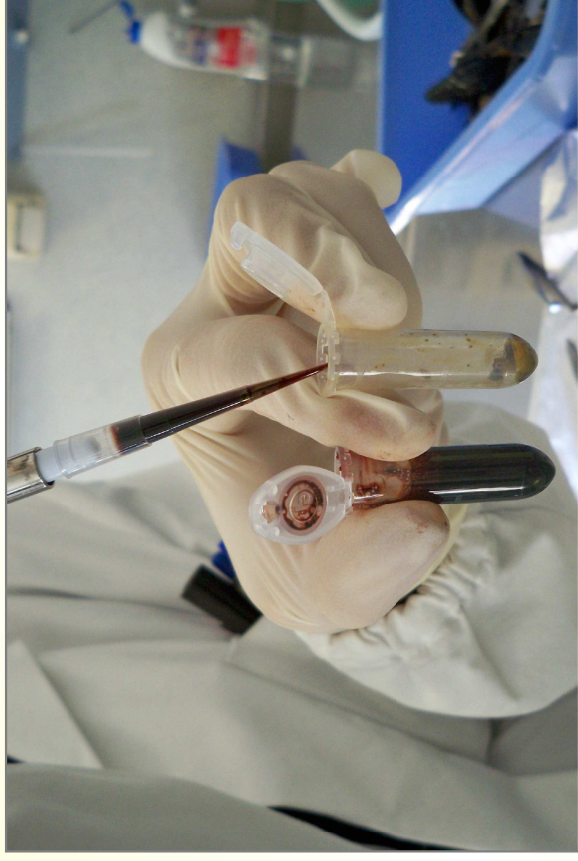
**4. Lavare il pellet** due volte con una soluzione salina pH= 7,4 **per eliminare la tripsina in eccesso**. Centrifugare a 200g per 5 minuti a 4°C.



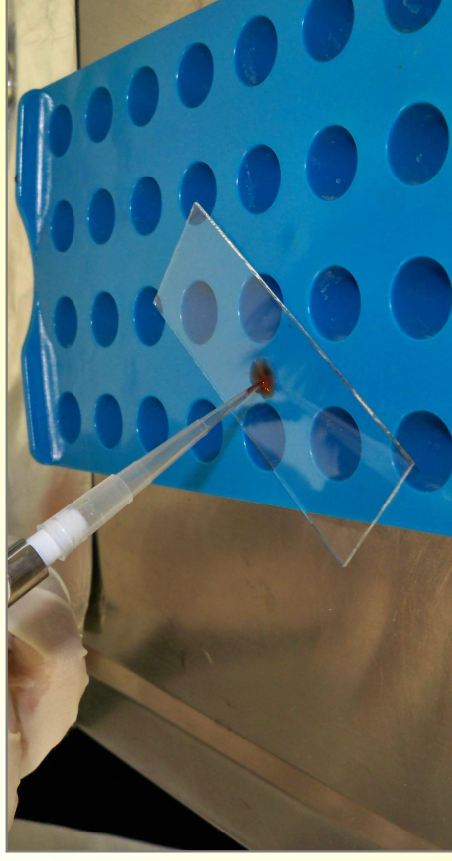
# STABILITA' MEMBRANE LISOSOMIALI (5)

POS SIP 017 INT

**5. Risospendere le cellule** in soluzione salina pH= 7,4 pipettando delicatamente. **Aggiungere un ugual volume di una soluzione di rosso neutro** (0,1 mg/ml DMSO). **Incubare in camera umida al buio per 60-90 minuti.**



**6. Osservare una goccia della sospensione cellulare** al microscopio ottico con ingrandimento 40X.

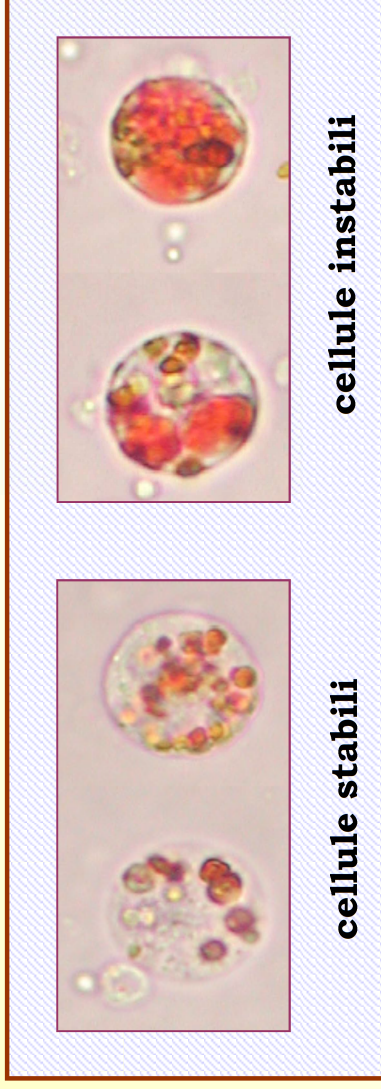




# STABILITA' MEMBRANE LISOSOMIALI (6)

POS SIP 017 INT

7. Contare almeno 50 cellule discriminando tra cellule stabili e cellule instabili.



8. Calcolare la % di cellule instabili:

**% cellule instabili = (n° cellule con lisosomi instabili / n° totale cellule) x 100**



Nel rapporto di prova il risultato viene espresso come:

“Stabilità delle membrane lisosomiali” (% di cellule instabili),  
riportando la media dei valori ottenuti dai 6-10 soggetti analizzati.

# FREQUENZA DEI MICRONUCLEI (1)

POS SIP 015 INT

## I micronuclei



Aggregati nucleari separati completamente dal nucleo.



Si formano per un danno del DNA a livello cromosomico a seguito di esposizione dell'organismo a inquinanti di origine ambientale.



Si osservano al microscopio ottico dopo aver colorato le cellule con Giemsa.



**Bolognesi and Fenech (2012).** Mussel micronucleus cytome assay. Nature Protocols 7, 1125–1137.

# FREQUENZA DEI MICRONUCLEI (2)

## POS SIP 015 INT

Manual on the biomarkers recommended for the med pol biomonitoring programme.  
United Nations Environment Programme Mediterranean Action Plan. Athens, 1999.



### **Il campione deve**

- Pervenire in laboratorio a T refrigerata
- Essere conservato a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Essere processato entro 24h dal prelievo



**Per ogni campione analizzare 6-10  
soggetti di dimensione omogenea.**



**Eeguire il saggio su  
emolinfa e/o branchie**



# FREQUENZA DEI MICRONUCLEI (3)

POS SIP 015 INT

## Emolinfa

Per ogni soggetto operare come segue:

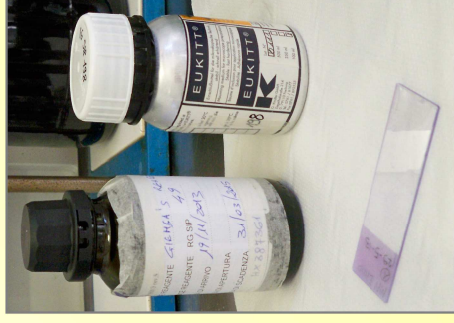
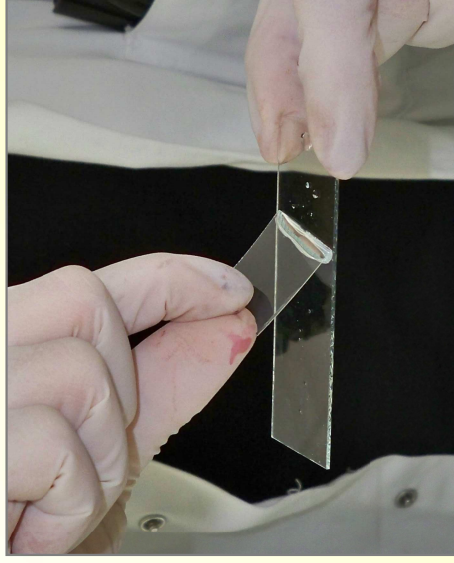
**1. Prelevare dal muscolo adduttore l'emolinfa.** Aggiungere un ugual volume di una soluzione salina pH=7,4. Centrifugare a 1000 rpm per 5 minuti.



**2. Fissare il pellet** con una soluzione metanolo:acido acetico (3:1). Incubare a T ambiente per 20 minuti.

**3. Strisciare una goccia di sospensione cellulare su un vetrino portaoggetti.**

**4. Colorare il vetrino con una soluzione Giemsa 3%. Montare il vetrino con Eukitt.**



# FREQUENZA DEI MICRONUCLEI (4)

POS SIP 015 INT

## Branchie

Per ogni soggetto operare come segue:

1. **Prelevare, sminuzzare e aggiungere alle branchie la dispasi** (0,1 mg/ml). Incubare per 10 minuti a 37°C.



2. **Filtrare il campione** per eliminare il tessuto non digerito. Centrifugare a 1000 rpm per 10 minuti.



3. **Fissare il pellet** con metanolo:acido acetico (3:1) per 20 minuti a T ambiente.
4. Strisciare una goccia di sospensione cellulare su un **vetrino** portaoggetti.
5. **Colorare** il vetrino con Giemsa 3%. **Montare il vetrino** con Eukitt.



# FREQUENZA DEI MICRONUCLEI (5)

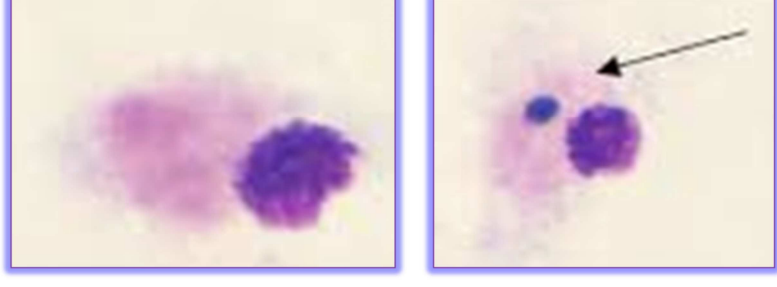
POS SIP 015 INT

## 6. Osservare i vetrini al microscopio ottico con ingrandimento 1000X.

Per ogni soggetto contare 2000 cellule discriminando tra le cellule con micronuclei e quelle che presentano un nucleo integro.

### I micronuclei:

- Sono corpuscoli di forma rotondeggiante o ovale;
- Hanno dimensioni comprese tra 1/10 e 1/30 del nucleo;
- Presentano una colorazione uguale o più chiara rispetto alla cromatina del nucleo;
- Sono localizzati in prossimità del nucleo ma non sono in contatto con esso;
- Non rifrangono la luce.



**Galloway et al., 2010.** Assessment of Genotoxicity Following Exposure to Hydrocarbons: The Micronucleus Assay. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.



# FREQUENZA DEI MICRONUCLEI (6)

POS SIP 015 INT

**7. Calcolare** la frequenza dei micronuclei (FMN) e, per maggiore accuratezza del dato, la FMN‰:

**FMN= n° cellule con micronuclei / n° totale di cellule esaminate**

**FMN‰= FMN x 1000**



Nel rapporto di prova il risultato viene espresso come:

«Frequenza dei micronuclei” (FMN‰),  
riportando la media dei valori ottenuti dai 6-10 soggetti analizzati.

# ATTIVITA' DELL'ACETILCOLINESTERASI (1)

POS SIP 014 INT

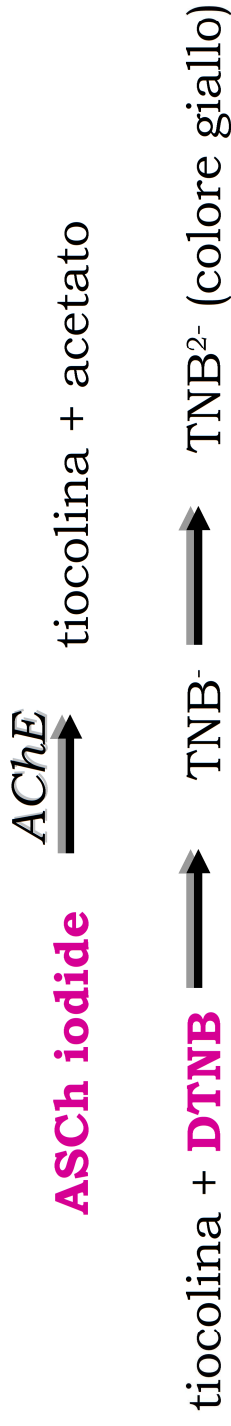
## Acetilcolinesterasi (AChE)



Enzima presente nel tessuto nervoso sia di vertebrati che di invertebrati.  
E' implicato nella trasmissione dell'impulso nervoso.



La sua attività tende a diminuire se l'organismo viene esposto a pesticidi  
(carbammati e organofosfati) e metalli pesanti.



**AChE:** Acetilcolinesterasi

**DTNB:** acido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico)

**ASCh iodide:** Acetiltiocolina ioduro

**TNB:** ione 2-nitro-5-tiobenzoato

# ATTIVITA' DELL'ACETILCOLINESTERASI (2)

POS SIP 014 INT

**Ellman et al., 1961.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 7: 88-95.



## **Il campione deve**

- Pervenire in laboratorio a T refrigerata
- Essere conservato a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Essere processato entro 24h dal prelievo



**Effettuare il saggio su emolinfa e/o branchie**



**Per ogni campione analizzare  
6-10 pool di emolinfa  
e/o 6-10 pool di branchie**



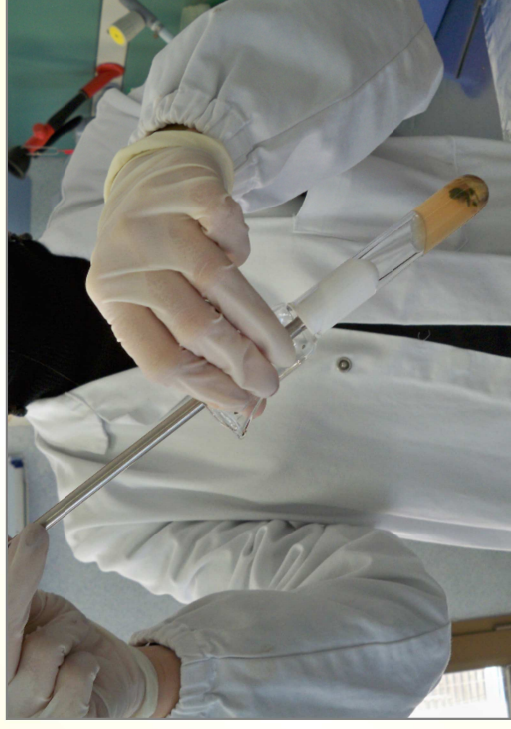


# ATTIVITA' DELL'ACETILCOLINESTERASI (3)

POS SIP 014 INT

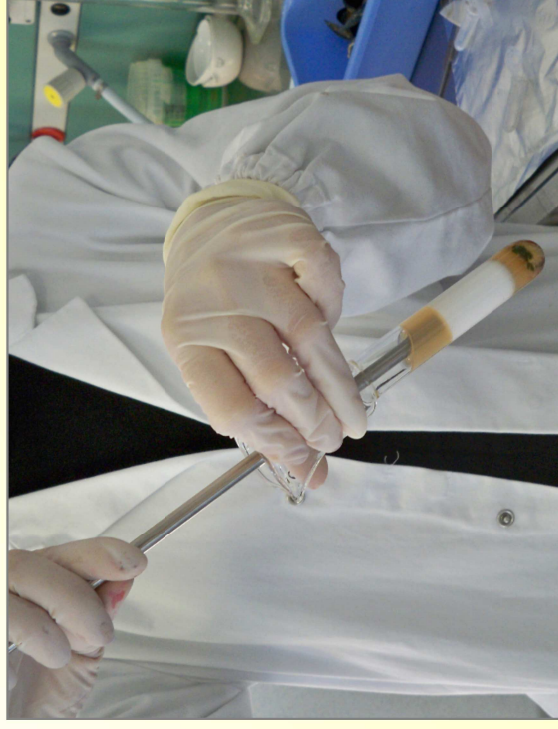
## Pool di emolinfa

1. **Prelevare l'emolinfa dal muscolo adduttore di 3-5 soggetti.**
2. Centrifugare a 3000g per 5 minuti a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ;
3. Aliquotare il surnatante e conservare il campione a  $-80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi.



## Pool di branchie

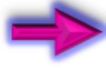
1. **Prelevare le branchie da 3-5 soggetti.**
2. Pesare 0,5 g di tessuto.
3. Aggiungere 1,5 ml di una soluzione salina pH= 7,4. Omogeneizzare il campione.
4. Centrifugare a 10000g per 10 minuti a  $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ;
5. Aliquotare il surnatante e conservare il campione a  $-80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi.



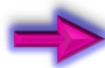
# ATTIVITA' DELL'ACETILCOLINESTERASI (4)

POS SIP 014 INT

**Su ogni pool**



**Determinare la concentrazione delle proteine totali (mg/ml) come descritto nella POS SIP 018 INT: Proteine totali - Metodo di Bradford.**



**Misurare l'Attività dell'Acetilcolinesterasi**





# ATTIVITA' DELL'ACETILCOLINESTERASI (5)

POS SIP 014 INT

## Attività dell'Acetilcolinesterasi

Il saggio viene eseguito a  $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

**1.** Aliquotare in una cuvetta:

- Buffer Tris-HCl 0,1M pH=7,4
- il campione
- DTNB 10 mM
- ASCh iodide 50 mM

**2.** Leggere immediatamente l'assorbanza a 412 nm ogni minuto per 5 minuti.



La cinetica di reazione deve essere lineare nell'arco dei 5 minuti o arrivare a plateau.



# ATTIVITA' DELL'ACETILCOLINESTERASI (6)

POS SIP 014 INT

3. Calcolare l'attività dell'Acetilcolinesterasi (nmol ASCh iodide/min/mg proteine)

$$\text{Attività dell'AChE} = \frac{\Delta A/\text{min} \times \text{Vol}_T \times 1000}{\epsilon_{412} \times \ell \times \text{Vol}_s \times [\text{proteine}]} \times 1000$$

$\Delta A/\text{min}$  = variazione di assorbanza al minuto

$\text{Vol}_T$  = volume totale del saggio

$\epsilon_{412}$  = coefficiente di estinzione molare del TNB ( $1,36 \times 10^4/\text{M}/\text{cm}$ )

$\ell$  = cammino ottico della radiazione nella soluzione (1 cm)

$\text{Vol}_s$  = volume del campione utilizzato nel saggio

$[\text{proteine}]$  = concentrazione delle proteine nel campione (mg/ml)



Nel rapporto di prova il risultato viene espresso come:

«Attività dell'acetilcolinesterasi» (nmol/min/mg proteine),  
riportando la media dei valori ottenuti dai 6-10 pool di branchie (o  
di emolinfa) analizzati.

# I BIOMARKERS .....

*..... Procedure in fase di allestimento*

« Metallotioneine»

« Perossidazione lipidica»

« Glutazione totale»

« Fagocitosi»





An underwater photograph showing a school of dark-colored fish swimming in clear, turquoise water. Large, dark, leafy seaweed or coral structures are visible in the background and foreground, creating a natural habitat setting. The lighting is bright, suggesting a shallow depth.

***GRAZIE PER L'ATTENZIONE !***