

STRATEGIE PER LO SVILUPPO E LA CARATTERIZZAZIONE DI BIOMARKERS PER INTERFERENTI ENDOCRINI

Antonio Menditto, Dipartimento di Sanità alimentare ed animale, Istituto Superiore di Sanità

La valutazione del rischio per la salute umana derivante dall'esposizione ai composti chimici, inclusi quelli classificati come in grado di interferire con il sistema endocrino, prevede quattro distinte fasi: l'identificazione dei pericoli, la valutazione della relazione dose-risposta, la valutazione e la stima dell'esposizione connessa con l'uso della sostanza e infine la caratterizzazione del rischio. A sua volta, la valutazione dell'esposizione si avvale dell'informazione ottenuta dalla misurazione dei livelli di esposizione sia esterna, in varie matrici ambientali quali alimenti, aria, acqua e suolo (monitoraggio ambientale), che interna (monitoraggio biologico, MB).

Il MB consiste nella misurazione, continua o ripetuta, di sostanze potenzialmente tossiche, o dei loro metaboliti, o degli effetti biochimici — nei tessuti, nelle secrezioni, nelle escrezioni o nell'aria espirata, o loro combinazioni— al fine di valutare l'esposizione e i rischi per la salute attraverso un confronto con appropriati valori di riferimento sulla base della conoscenza della probabile relazione causale tra l'esposizione e i risultanti effetti dannosi sulla salute.

I parametri oggetto delle misurazioni nell'ambito del MB sono indicati con il nome di biomarker (BM) o indicatori biologici ed includono parametri di natura chimica, biochimica, fisiologica o comportamentale, misurabili nella specie umana. La loro funzione è quella di rilevare un evento che può influenzare o predire l'insorgenza e/o l'evoluzione di una malattia, e sono fondamentali al fine di stabilire un nesso causale tra l'esposizione umana a sostanze tossiche e il manifestarsi di alterazioni funzionali o morfologiche. I BM sono classificati in BM di esposizione (indicatori di dose interna e indicatori di dose biologicamente efficace), BM di effetto e BM di suscettibilità. Per quanto riguarda i BM di pertinenza laboratoristica, la loro misurazione viene effettuata in una ampia gamma di matrici biologiche di provenienza umana (per es., urine, sangue intero, siero, capelli, unghie, denti decidui, latte materno, saliva, meconio, aria espirata, sangue dal cordone ombelicale, ecc.). Per ogni BM e per ogni matrice, i risultati della misura ottenuti dovrebbero essere confrontati con degli appropriati valori di riferimento, derivati in genere da studi eseguiti su campioni tratti da popolazioni di soggetti non esposti.

I BM di esposizione sono in genere rappresentati dai composti chimici come tali o dai loro metaboliti (indicatori di dose); fra i BM di esposizione devono essere compresi anche gli indicatori che riflettono, a livello molecolare, gli effetti indotti dagli stessi composti chimici o dai loro metaboliti (indicatori di dose biologicamente efficace). Questi ultimi indicatori sono particolarmente importanti in quanto riflettono la frazione biologicamente attiva degli xenobiotici, ossia la frazione in grado di interagire con le macromolecole a livello dell'organo bersaglio. Sono rappresentati soprattutto dagli addotti che si vengono a formare tra un agente chimico e gli acidi nucleici o le proteine.

I BM di effetto si riferiscono ad alterazioni biochimiche o funzionali misurabili e reversibili a carico degli organi bersaglio. Sono in genere degli indicatori preclinici di condizioni patologiche. Possono essere specifici o aspecifici. Gli indicatori non specifici integrano l'effetto dovuto all'esposizione a più composti chimici. Tra i BM di effetto i più utilizzati sono quelli relativi alla funzione dei vari organi (per esempio beta2-microglobulina e cistatina C per la funzionalità renale) e delle ghiandole endocrine (ad es. dosaggio degli ormoni tiroidei e degli ormoni steroidei) quelli collegati al danno citogenetico (per es. 8-ossi-deossi-guanosina nelle urine; il test COMET, le rotture e le aberrazioni cromosomiche). Sono considerati BM di effetto anche le alterazioni del normale sviluppo fisiologico (per es. le alterazioni dello sviluppo sessuale quali il ridotto volume dei testicoli, la ritardata o anticipata comparsa dei caratteri sessuali secondari, ecc.).

I BM di suscettibilità sono un indice della predisposizione, ereditaria o acquisita, di un singolo individuo a subire gli effetti di uno xenobiotico o di un gruppo di composti chimici. A differenza dei geni associati a malattie ereditarie, i geni di suscettibilità sono in grado di modificare il rischio

per un effetto avverso allorché vi sia esposizione ad agenti chimici pericolosi; ma di per sé non sono né necessari né sufficienti nel determinare la patologia.

In generale, gli studi epidemiologici che utilizzano i BM rientrano nell'ambito degli studi appartenenti all'epidemiologia molecolare, la cui finalità è quella di stabilire un nesso tra il manifestarsi di patologie e l'esposizione a sostanze tossiche. Gli studi di epidemiologia molecolare che utilizzano i BM sono simili agli studi epidemiologici tradizionali per quanto riguarda il disegno, l'analisi e l'interpretazione. Necessitano tuttavia, in una fase preliminare, di studi volti allo sviluppo e alla validazione dei BM stessi (studi transizionali), il cui scopo è quello di caratterizzare il BM piuttosto che il fenomeno biologico di cui il BM stesso è espressione. Gli studi transizionali a loro volta si dividono in studi di sviluppo, studi di caratterizzazione e studi applicati.

Gli studi di sviluppo consistono in studi che prevedono la valutazione delle caratteristiche di affidabilità del metodo —specificità, limiti di rivelabilità e quantificazione, esattezza, precisione, sensibilità, intervallo di linearità, robustezza, incertezza di misura — quando applicato a campioni di origine umana (validazione analitica sul campo), e in studi di valutazione delle procedure per la raccolta, il trattamento, l'analisi e la conservazione dei campioni.

Gli studi di caratterizzazione prevedono il dosaggio del BM in campioni di popolazioni umane per lo studio della variabilità biologica (inter- e intra- individuale) e la definizione dei valori di riferimento, dei fattori di confondimento (endogeni ed esogeni) e dei modificatori di effetto.

La validazione sul campo (*field validation*) avviene attraverso l'esecuzione di studi transizionali applicati di tipo epidemiologico che possono permettere la valutazione delle relazioni tra livelli di esposizione (attraverso BM di dose), dose biologica efficace, effetto biologico precoce, alterazioni strutturali o funzionali (attraverso BM di effetto) e infine l'occorrenza di esiti e patologie conclamate. Per quanto riguarda i BM di effetto, il disegno di uno studio transizionale sul campo, volto a validare un BM come predittivo di esiti, è più complicato rispetto a quelli volti a validare i BM di esposizione. Nel caso dei BM di effetto una risposta precede la comparsa di un esito che può essere raro nella popolazione oggetto dello studio. Il più efficace disegno sperimentale è uno studio longitudinale di coorte, ma spesso l'esito —che costituisce la variabile indipendente— oltre a essere raro ha luogo molto tempo dopo la risposta del BM. Per questo motivo, gli studi di questo tipo devono essere ampi e devono durare per un lungo periodo di tempo, cosa che molto spesso può risultare impossibile. Un valido compromesso per la validazione dei marcatori di effetto è l'esecuzione di studi caso-controllo nidificati. In questo caso i campioni biologici vengono raccolti in momenti appropriati dopo l'esposizione e conservati fino al manifestarsi, nei soggetti dello studio, degli esiti di interesse. Nell'ambito degli studi transizionali applicati trovano un loro specifico utilizzo i BM di suscettibilità. Conclusa la fase di validazione, i BM trovano applicazione nelle diverse tipologie di studi epidemiologici a carattere osservazionale, siano essi di coorte o longitudinali, trasversali o di prevalenza, oppure studi di tipo caso-controllo.

Attualmente le nuove discipline ‘-omiche’ (genomica e proteomica, tossicogenomica), quando applicate a studi di epidemiologia molecolare, permettono di stimare direttamente (utilizzando il DNA) o indirettamente (utilizzando l'RNA) e in singoli esperimenti i cambiamenti nell'espressione in un gran numero di geni/proteine indotti da xenobiotici. Per esempio, tali discipline permettono di studiare la variabilità interindividuale nei geni (polimorfismo) codificanti gli enzimi coinvolti nel metabolismo (di prima e seconda fase) sulla dose biologicamente attiva degli xenobiotici. La presenza di geni che codificano enzimi con funzionalità ridotta o aumentata possono, a parità di dose assorbita, modificare il rischio di comparsa di effetti avversi per la salute associati alla presenza, nel singolo soggetto, di polimorfismi che comportano una aumentata suscettibilità individuale. La metodica dei DNA microarray è una nuova tecnica di biologia molecolare che sta rapidamente trovando applicazione negli studi di tossicogenomica. Si tratta di una tecnologia ad alta capacità che permette l'analisi d'espressione di molti geni in maniera simultanea e in uno stesso esperimento; il confronto contemporaneo dell'espressione genica tra campioni di controllo (*in vitro*) o sani (*in vivo*) e campioni trattati o esposti a xenobiotici, potrebbe permettere l'identificazione e la definizione di prodotti d'espressione candidati come nuovi BM.