

APPROCCI ECOTOSSICOLOGICI EMERGENTI: DAI SEGNALE MOLECOLARI ALLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO ECOLOGICO

Francesco Regoli

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Negli ultimi due decenni è cresciuta molto la nostra conoscenza sulla presenza, distribuzione ambientale ed effetti biologici di molti inquinanti come metalli pesanti, oli e Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), organo-alogenati, pesticidi, bifenili policlorurati (PCB) ritardanti di fiamma, organo-stannici ed estrogenici per citare i più famosi. L'approccio ecotossicologico ha avuto un ruolo importante e l'utilizzo di organismi bioindicatori (in senso ampio) ha permesso di comprendere le cinetiche e i meccanismi di bioaccumulo, e anche di chiarire come queste sostanze interagiscono con le componenti cellulari determinando l'attivazione di meccanismi di detossificazione, le vie di biotrasformazione, l'insorgenza di alterazioni cellulari o di effetti biologici potenzialmente avversi. Queste conoscenze, inizialmente accolte con un certo scetticismo, si sono col tempo dimostrate sempre più affidabili e oggi sono imprescindibili per qualsiasi reale valutazione dell'impatto causato dai contaminanti chimici sulla salute dell'ambiente e degli organismi.

La scelta degli organismi da utilizzare come bioindicatori è grandemente aumentata, offrendo nuove possibilità di applicazione e di studio. Si va dalle specie dello zooplankton gelatinoso, fino ai predatori terminali, si continuano anche ad utilizzare i "vecchi" modelli ma con approcci innovativi: i mitili e i ricci di mare, ad esempio, sono stati usati per chiarire fondamentali processi biologici di base, e per caratterizzare o mettere a punto sistemi diagnostici basati sui meccanismi di azione molecolare dei contaminanti. Non abbiamo solo modelli in vivo, ma anche nuovi modelli *in vitro*, dalle colture cellulari tradizionali a quelle dei fibroblasti di cetacei, fino alle *slice tissues*. Possiamo testare vescicole di membrana, organelli isolati, e numerosi kit sono oggi disponibili per saggi ecotossicologici convenzionali, ma anche per analisi innovative mirate a evidenziare specifici effetti tossicologici: i *reporter gene assay* sfruttano le specificità recettoriali di molte classi di inquinanti (diossine, IPA, estrogenici, solo a titolo di esempio) per attivare un gene *reporter* i cui livelli di espressione sono facilmente quantificabili. L'incredibile crescita che si è avuta negli ultimi dieci anni per questi supporti analitici, ha certamente contribuito ai successi dell'ecotossicologia moderna.

Anche le tecnologie analitiche si sono evolute, passando dallo screening degli effetti di singole molecole a piattaforme *high-throughput* che consentono di ottenere contemporaneamente numeri impressionanti di dati quali- e quantitativi. I modelli *in silico* rappresentano un aiuto importante per validare o indirizzare molti studi sperimentali e le tecnologie "omiche" (genomica, proteomica, metabolomica) sono divenuti termini comuni: vale tuttavia la pena ricordare che sono passati solo dieci anni dalla prima sessione interamente omica dedicata agli organismi marini durante il congresso PRIMO (*Pollutant Responses In Marine Organisms*) del 2007 a Florianopolis, Brasile. Oggi si possono usare organismi transgenici e stiamo sperimentando tessuti virtuali o ingegnerizzati, non solo nell'uomo ma anche nelle meduse e nei poriferi, per testare nuove ipotesi tossicologiche o applicazioni biotecnologiche.

L'aumento della quantità e della complessità dell'informazione scientifica che si può ottenere è stato accompagnato anche dallo sviluppo di nuove procedure bioinformatiche e di elaborazione

dei dati, tra cui le architetture neurali di pathway metabolici o i profili trascrizionali, e la *system toxicology* si è sviluppata proprio per integrare modelli computazionali sempre più complessi.

Oltre a questi aspetti di sviluppo sia tecnologico che delle conoscenze dei meccanismi di azione dei contaminanti, è certamente cambiato il nostro modo di pensare all'ecotossicologia, e siamo passati da un iniziale paradigma di una relazione lineare e continua tra livello di esposizione ed entità della risposta, ad una visione molto più dinamica. Sappiamo che le risposte e le normali funzioni biologiche non sono necessariamente perturbate da basse dosi di esposizione, e anche cambiamenti cellulari precoci possono indicare una pressione ma non riflettersi in un danno, grazie alla presenza di altri meccanismi compensatori o adattativi; solo al di sopra di certi livelli di esposizione e di effetto biologico si arriva alla compromissione di un pathway metabolico o dello stato di salute di un organismo, con effetti che possono divenire irreversibili, e quindi persistere anche se si rimuove il contaminante o il fattore di stress che li ha causati.

Con questi approcci abbiamo iniziato a caratterizzare singoli componenti molecolari che modulano la risposta alla tossicità, tra cui Nrf2, un fattore di trascrizione che regola l'induzione delle difese antiossidanti, molto poco conosciuto negli organismi marini fino a qualche anno fa, nonostante l'importanza dei *biomarker* di stress ossidativo (1). Abbiamo conoscenze molto più dettagliate sui quei sistemi di risposta che tradizionalmente sono considerati come i più specifici nei confronti di specifiche classi di inquinanti, tra cui il sistema del citocromo P450 per la biotrasformazione degli xenobiotici organici, le colinesterasi inibite da pesticidi organo-fosforici e carbammati, le metallotioneine in risposta ai metalli e le condizioni di stress ossidativo di primaria importanza nel modulare la tossicità degli inquinanti. Nel tempo tuttavia, abbiamo chiarito come questi singoli componenti sono tra loro integrati all'interno di pathway e network apparentemente complicatissimi, come quello che lega i meccanismi pro-ossidanti di molti inquinanti chimici con la risposta delle difese antiossidanti (2).

Pur senza entrare in eccessivi dettagli, gli xenobiotici organici (come diossine, IPA, PCB, organo-alogenati), sono noti indurre il sistema di biotrasformazione del citocromo P450, i cui enzimi catalizzano reazioni relativamente semplici da un punto di vista biochimico ma di grandissima importanza da un punto di vista biologico. Lo scopo generale di queste reazioni è quello di trasformare molecole idrofobiche in molecole più solubili e facilmente eliminabili dalla cellula. Il sistema genera tuttavia molti metaboliti e alcuni di questi sono ben più attivi del composto di partenza: noto è il caso del benzo[a]pirene che viene trasformato in un diol-epossido che forma addotti stabili al DNA (acido desossiribonucleico) rendendo cancerogena questa sostanza. I metalli sono spesso dei potenti pro-ossidanti attraverso meccanismi diversi come l'inibizione delle catene di trasporto elettroniche, le reazioni di Fenton e Haber Weiss, la deplezione di antiossidanti e conseguenti danni cellulari che possono ulteriormente aumentare la produzione di ROS ed essere così a loro volta esacerbati. Esistono poi meccanismi forse meno noti, ma ugualmente importanti attraverso cui molte sostanze chimiche generano specie reattive dell'ossigeno, come il ciclo redox in cui un composto inquinante è inizialmente ridotto a specie radicalica, reagisce con l'ossigeno generando anione superossido e tornando alla specie originaria che sarà nuovamente ridotta. Anche la via di trasformazione dei chinoni può avere un ruolo determinante nella insorgenza della carcinogenesi, con idrochinoni e semichinoni (ottenuti da riduzioni mono o bi-elettroniche) che sono apparentemente simili da un punto di vista chimico, ma tossicologicamente molto diversi. Tutte queste vie sono tra loro intimamente connesse, tutte producono e sono modulate da specie reattive dell'ossigeno con complesse interazioni ossidative che a loro volta determinano la comparsa di numerose forme di tossicità cellulare. Tra quelle più frequentemente misurate in ecotossicologia come tipici target cellulari di tossicità ossidativa vi sono i lisosomi, le proteine, i lipidi e il DNA. La comparsa dell'8-idrossi deossiguanosina, ossidazione tipicamente causata dal radicale idrossilico, o la perdita di integrità strutturale del DNA misurata in termini di rotture dei filamenti (test conosciuto come *Comet Assay*) o come

micronuclei, sono tipiche risposte evidenziabili in organismi esposti a contaminanti chimici come gli IPA o metalli (3-11).

Oggi sappiamo inoltre che non sono solo i contaminanti tradizionali a rappresentare un rischio in termini di effetti ecotossicologici, e negli ultimi anni la nostra conoscenza e consapevolezza è aumentata esponenzialmente sui cosiddetti contaminanti emergenti. I primi ad essere evidenziati furono i distruttori ormonali (12), già noti alla fine degli anni '60 del secolo scorso, ma oggi sappiamo molto sulla distribuzione dei farmaci nell'ambiente, plastiche e microplastiche, nanomateriali, o molecole di origine naturale come molti metaboliti o tossine algali. I farmaci sono contaminanti emergenti non perché è da poco che vengono riversati nell'ambiente ma perché solo recentemente è stata descritta la loro rilevanza come contaminanti. Sono numerose le classi di farmaci che si ritrovano comunemente negli ambienti acquatici come anti-infiammatorie analgesici, antidepressivi, antiepilettici, regolatori lipidici, antibiotici. Il problema nasce dall'enorme consumo di queste sostanze (oltre 200 tonnellate l'anno di ibuprofene in Italia), spesso il non adeguato smaltimento domestico di questi prodotti e la scarsa efficienza di molti impianti di depurazione, soprattutto quelli più vecchi. Dalla metà degli anni 2000 si è cominciata ad analizzare più sistematicamente la presenza dei farmaci nelle acque, e questi composti sono stati ritrovati non solo nelle acque di scarico, ma anche nei fiumi, nei corsi d'acqua, in mare e, in alcuni casi, anche nelle acque potabili degli acquedotti di molte città (13).

Per quanto riguarda gli effetti che queste sostanze inducono in specie non target dell'ambiente marino, è già stato dimostrato che i mitili possono accumulare numerosi antiinfiammatori, e quindi rappresentano utili bioindicatori per dimostrare la presenza ambientale di composti come il nimesulide il diclofenac e l'ibuprofene; queste sostanze inoltre sono biologicamente attive anche a basse dosi di esposizione, e in grado di attivare in questi organismi una serie di risposte che vanno dalla modulazione dei geni fino ad alterazioni cellulari e fisiologiche (14-15).

Passando dalla scala di laboratorio alla valutazione della diffusione e dell'entità del problema dei farmaci negli ambienti costieri, sono state effettuate recentemente delle analisi nei tessuti di mitili raccolti in numerosi siti della costa adriatica e di quella tirrenica, andando a ricercare la presenza di composti appartenenti alle principali classi di farmaci usati a livello umano tra cui gli antinfiammatori non steroidei, gli antiepilettici, gli antidepressivi e i regolatori lipidici. Il 100% degli organismi analizzati è risultato contenere almeno una delle molecole ricercate, il 92% almeno due, il 66% almeno 3 tipologie di farmaci. Il composto, che è stato ritrovato con maggiore frequenza nei tessuti dei mitili, è la carbamazepina che non a caso è stata recentemente proposta come un affidabile indicatore della presenza antropica, andando a sostituire quello che fino a qualche tempo fa era considerato il piombo. Questi risultati non devono tuttavia generare allarmismo: le metodologie analitiche permettono di misurare livelli molto molto bassi di queste sostanze e in effetti le concentrazioni rilevate nei mitili naturali sono di gran lunga inferiori rispetto, ad esempio, a quelle normalmente assunte ad uso terapeutico. Nonostante non ci sia assolutamente alcun rischio per la salute dell'uomo, è tuttavia evidente una situazione ambientale che non possiamo più ignorare e che evidenzia la necessità di affrontare questo problema attraverso una stretta sinergia tra numerosi attori pubblici e privati. La ricerca scientifica, attraverso l'aumento delle conoscenze e la divulgazione dei risultati, dovrebbe fare da volano per l'educazione e la formazione dei cittadini suggerendo una maggiore attenzione nell'utilizzo e nel corretto smaltimento dei farmaci. La classe medica, seguendo un esempio già promosso in alcuni paesi del nord Europa, a parità di finalità terapeutica, dovrebbe iniziare a prescrivere il principio attivo a minor impatto per l'ambiente e di conseguenza anche l'industria farmaceutica, pur mantenendo come prioritario lo studio dell'effetto terapeutico sull'uomo, dovrebbe tenere in considerazione il destino ambientale di queste molecole; infine l'innovazione tecnologica può investire per migliorare i sistemi di depurazione e di controllo degli scarichi.

Le plastiche e MicroPlastiche (MP) fino a poco tempo fa erano considerate un problema di natura estetica, mentre oggi sappiamo che possono essere ingerite da tutti gli organismi. Oltre a possibili danni fisici o meccanici, preoccupa la grande capacità delle MP di adsorbire contaminanti presenti nell'acqua (una sorta di effetto spugna) e di trasferirli insieme ad altri additivi chimici, agli organismi che le hanno ingerite. Dopo l'ingestione, le microplastiche possono trasferire inquinanti nei tessuti degli organismi, rappresentando dei veri e propri *carrier*, con risposte anche molto sensibili, dal profilo trascrizionale fino ad alterazioni cellulari, soprattutto a carico del sistema immunitario (16). Risultati recenti hanno evidenziato che nel caso di ingestione di MP contaminate, si passa da una tossicità inizialmente dovuta all'effetto fisico delle particelle, poi ad una combinazione di effetti fisici e chimici, mentre a tempi di esposizione più lunghi prevalgono gli effetti chimici dei contaminanti desorbiti (17).

Se farmaci e microplastiche rappresentano solo alcuni esempi di contaminanti emergenti, l'ecotossicologia moderna si deve occupare anche dei cambiamenti climatici (soprattutto il riscaldamento, l'acidificazione e l'ipossia). Questi fattori possono causare effetti tossicologici diretti e compromettere lo stato di salute degli organismi marini, ma possono anche interagire con la presenza di inquinanti, influenzando sia il loro bioaccumulo che la sensibilità degli organismi esposti (18). Realizzare l'importanza di questa complessità e conoscere i meccanismi tossicologici sono aspetti fondamentali per capire le interazioni tra fattori ambientali e prevedere le conseguenze nel breve e nel lungo termine del disturbo ambientale. Per questo motivo oggi, forse come mai prima, l'ecotossicologia ha un ruolo centrale nelle analisi di rischio ecologico che sono tipicamente basate su approcci multidisciplinari. La centralità dell'ecotossicologia (con le sue diverse applicazioni) permette di evidenziare interazioni e fare collegamenti tra le diverse tipologie di indagini e risultati, dalla chimica alla biodisponibilità, dagli effetti molecolari a quelli ecologici, fino a possibili valutazioni sulla salute umana. Da questi modelli concettuali, stiamo passando a veri modelli di elaborazione quantitativa dei dati (19), con l'applicazione di criteri di integrazione ponderata che abbandonano l'approccio tabellare o la logica del risultato peggiore, dando invece un peso all'importanza dei parametri (chimici e biologici) che vengono misurati, all'entità delle differenze che vengono misurate non solo in relazione ai controlli ma anche a delle specifiche soglie (*threshold*). Questo approccio, basato sull'integrazione ponderata di dati chimici ed ecotossicologici, è stato recentemente recepito nella nuova normativa sulla classificazione dei sedimenti sottoposti a movimentazione (il DM 173/2016).

In conclusione, è evidente l'importanza che ha avuto l'ecotossicologia nel comprendere i meccanismi di azione dei contaminanti ambientali, e l'evoluzione che si è avuta con l'utilizzo di nuovi modelli, nuovi approcci metodologici ma anche nuove sfide ecotossicologiche. È tuttavia sentita la necessità di un'azione coordinata a livello nazionale per promuovere un approccio scientificamente rigoroso ma al tempo stesso *user-friendly*, e supportare processi più completi di valutazione del rischio ecologico e di decisioni sito-specifiche.

Bibliografia

1. Giuliani ME, Regoli F. Identification of the Nrf2-Keap1 pathway in the European eel *Anguilla anguilla*: role for a transcriptional regulation of antioxidant genes in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 2014;150:117-23.
2. Regoli F, Giuliani ME. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar Environ Res* 2014;93:106-17.
3. Barouki R, Morel Y. Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol* 2001;61:511-6.

4. Cajaraville MP, Cancio I, Ibabe A, Orbea A. Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Micros. Res Technol* 2003;61:191-202.
5. Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicol* 2008;246:24-33.
6. Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2004;37(12):1921-42.
7. Limón-Pacheco J, Gonsbatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 2009;674(1-2):137-47.
8. Nikinmaa M, Rytönen KT. Functional genomics in aquatic toxicology-do not forget the function. *Aquat Toxicol* 2011;105(3):16-24.
9. Regoli F, Frenzilli G, Bocchetti R, Annarumma F, Scarcelli V, Fattorini D, Nigro M. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquat Toxicol* 2004;68(2):167-78.
10. Regoli F, Giuliani ME, Benedetti M, Arukwe A. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquat Toxicol* 2011;105(3):56-66.
11. Stegeman JJ, Lech JJ. Cytochrome P450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ Health Perspect* 1991;90:101-9.
12. Canesi L, Borghi C, Ciacci C, Fabbri R, Lorusso LC, Vergani L, Marcomini A, Poiana G. 2008. Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Aquat. Toxicol* 2008;87:272-9.
13. Mezzelani M, Gorbi S, Regoli F. Pharmaceuticals in the aquatic environments: evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Mar Environ Res* 2018;140:41-60.
14. Mezzelani M, Gorbi S, Fattorini D, d'Errico G, Benedetti M, Milan M, Bargelloni L, Regoli F. Transcriptional and cellular effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in experimentally exposed mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 2016;180:306-19.
15. Mezzelani M, Gorbi S, Fattorini D, d'Errico G, Consolandi G, Milan M, Bargelloni L, Regoli F. Long-term exposure of *Mytilus galloprovincialis* to diclofenac, Ibuprofen and Ketoprofen: Insights into bioavailability, biomarkers and transcriptomic changes. *Chemosphere* 2018;198:238-48.
16. Avio CG, Gorbi S, Regoli F. Plastics and microplastics in the oceans: from emerging pollutants to emerged threat. *Mar Environ Res* 2017;128:2-11.
17. Pittura L, Avio CG, Giuliani d'Errico G, Keiter S, Cormier B, Gorbi S, Regoli F. Microplastics as vehicles of environmental PAHs to marine organisms: combined chemical and physical hazards to the Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Front Mar Sci* 2018;5(103):1-15.
18. Nardi A, Mincarelli LF, Benedetti M, Fattorini D, d'Errico G, Regoli F. Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 2017;169:493-502.
19. Benedetti M, Ciaprinì F, Piva F, Onorati F, Fattorini D, Notti A, Ausili A, Regoli F. A multidisciplinary weight of evidence approach toward polluted sediments: integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environ Intern* 2012;38:17-28.