

Monitoraggio dello stress e dello stato ossidativo cellulare

Nell'ambito del progetto "Validazione di indicatori morfo-fisiologici della filiera produttiva di spigola (*Dicentrarchus labrax*) ed orata (*Sparus aurata*) e modello di riferimento (su base coordinata) per la costruzione di un sistema esperto", l'Unità Operativa 1 è stata incaricata di svolgere il monitoraggio dello stress attraverso l'utilizzo di indicatori ematici primari e dello stato ossidativo cellulare.

Si definisce stress quella condizione in cui l'equilibrio dinamico, chiamato omeostasi, di un organismo è minacciato o disturbato da stimoli estrinseci ed intrinseci, definiti come stressori (Chrousos & Gold, 1992). Ogni variazione ambientale, chimica o fisica (come regime idrodinamico, disponibilità dell'habitat, eutrofizzazione, temperatura, contaminanti, disponibilità alimentare, ecc.) viene percepita dalle specie ittiche e induce in esse una risposta, che, a seconda dell'intensità e del tempo di applicazione dello stress, può essere distinta in eustress e distress (se i meccanismi omeostatici sono adeguati o meno al ripristino dello stato fisiologico). L'obiettivo di questa linea di ricerca è di evidenziare precocemente situazioni di "distress", che minacciano l'omeostasi degli individui e che possono compromettere molte funzioni fisiologiche, come metabolismo, accrescimento, successo riproduttivo e resistenza alle patologie e infine anche avere un effetto sulla qualità delle carni e la loro deperibilità (Pankhurst & Sharples, 1992; Lowe et al., 1993). Si tratta pertanto di individuare quelle risposte a stressori sub-letali, che meglio possano essere utilizzate come indicatori. Nei pesci le risposte agli stressori sono variabili e flessibili in linea con la grande diversità di adattamenti che li rende capaci di vivere nella grande varietà di ambienti acquatici. È necessario pertanto studiare

* Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma, Tor Vergata

specie ittiche diverse e mettere a punto dei sistemi di riferimento, cioè i valori normali per ciascuna delle specie oggetto dello studio. Un qualsiasi stressore attiva l'asse ipotalamo-ipofisi-interrenale e provoca un rilascio anormale di catecolamine e corticosteroidi (Wendelaar Bonga, 1997). Il metodo più diffuso per diagnosticare precocemente lo stress nei pesci è la misura dell'aumentata concentrazione del cortisolo ematico, considerato indicatore primario. Ma poiché la risposta allo stress coinvolge vari livelli dell'organizzazione biologica (Mazeaud et al., 1977), monitorare un solo indicatore per verificare lo stato funzionale del pesce potrebbe non essere sufficiente. Secondo alcuni autori (Morgan & Iwama, 1997), bisognerebbe tener conto della sequenza temporale delle risposte ad uno stressore e selezionare una sequenza appropriata di indicatori. Inoltre, è irragionevole aspettarsi che un singolo indicatore di stress sia appropriato per tutti i tipi di stressori, che spesso hanno poco in comune (Moberg, 2000). Altri parametri plasmatici che variano in condizioni di stress (indicatori secondari) sono l'osmolalità e la concentrazione ionica. Infatti, il rilascio di catecolamine e corticosteroidi appare essere secondariamente accompagnato da una rottura delle barriere al flusso di acqua ed elettroliti, che seguono il gradiente osmotico (McDonald & Milligan, 1992). Inoltre, emoglobina ed ematocrito forniscono indicazioni relative alla richiesta di ossigeno in risposta allo stress, mentre il contenuto plasmatico delle proteine totali, del glucosio e degli acidi grassi liberi consentono di quantificare l'energia mobilizzata in risposta allo stress. In questa ricerca è prevista anche la verifica dei limiti dell'impiego di tali indicatori. In particolare, la grande variabilità inter-individuale della risposta allo stress impone la necessità di campionare un alto numero di individui; i tempi della risposta, che sono necessariamente brevi per gli indicatori primari, rendono inoltre indispensabile la rapidità delle operazioni di prelievo. Infatti, la difficoltà sta principalmente nella valutazione delle inevitabili variazioni prodotte dallo stress durante le procedure di campionamento del sangue (cattura, manipolazione, ecc.), variazioni che non vanno attribuite alla situazione che si vuole valutare. A tale proposito, va sottolineato che le variazioni di osmolalità e di concentrazione degli elettroliti, come indicatori secondari, potrebbero essere meno sensibili al campionamento. Per minimizzare il disturbo da campionamento, oltre che per il rispetto del benessere animale, si prevede l'utilizzo di dosi sub-letali di anestetico (olio di chiodi di garofano) se non fosse necessario il sacrificio degli animali e di dosi letali dello stesso qualora, oltre al prelievo di sangue, si rendesse necessario il campionamento di altri tessuti. La misura di indicatori di stress cronici, come quelli che caratterizzano lo stress ossidativo, sembra rappresentare un utile approccio da utilizzare in maniera integrata allo studio dei parametri classici

di risposta allo stress, con la finalità, toccando un più alto numero di livelli dell'organizzazione biologica, di ampliare il numero di indicatori da proporre in questo studio e per validare le valutazioni finali. In particolare, lo studio dello stress ossidativo in acquacoltura riveste un notevole interesse, incidendo sia sulla salute delle specie allevate che sulla qualità del prodotto (Tanaka et al., 2002). Lo stress ossidativo è caratterizzato da un aumento delle specie molecolari ossidanti (specie reattive dell'ossigeno - ROS, dell'azoto - RNS, e radicali liberi - R) e/o da una riduzione di quelle antiossidanti. Pertanto, il monitoraggio dello stress ossidativo prevede il dosaggio degli antiossidanti enzimatici e non enzimatici, il dosaggio delle molecole *target* dell'ossidazione ed il dosaggio di *by-products* dell'ossidazione. I parametri dello stress ossidativo misurati nella presente ricerca sono gli antiossidanti enzimatici (SOD, CAT, e GPx), gli antiossidanti idrofili (VitC, GSH-GSSG, acido urico) e lipofili (CoQnH²/CoQn, Vit E, beta carotene, Vit A); il pattern degli acidi grassi, le frazioni lipidiche, l'indice epatosomatico HSI; i livelli di lipoperossidi. Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) possono dare inizio alla catena di reazioni lipoperossidative, rischiose nelle specie ittiche per l'elevato contenuto di acidi grassi polinsaturi n-3 (C20:5 n-3 e C22:6 n-3) (Sargent et al., 1999). Lo studio del sistema antiossidante e dei meccanismi con i quali le diverse componenti agiscono nel ritardare la lipoperossidazione *post harvest* ha a che fare sia con il miglioramento della qualità del prodotto che con la sua deperibilità (Thompson et al., 2006).

BIBLIOGRAFIA

- CHROUSOS G.P. & GOLD P.W. (1992): *The concept of stress system disorders. Overview of physical and behavioural homeostasis*, «J. Am. Med. Assoc.», 267, pp. 1244-1252.
- LOWE T.E., RYDER J.M., CARRAGHER J.F., WELLS R.M.G. (1993): *Flesh quality in Snapper, Pagrus auratus, affected by capture stress*, «Journal of Food Science», 58 (4), pp. 770-773.
- MAZEAUD M.M., MAZEAUD F. & DONALDSON E.M. (1977): *Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review*, «Transactions of the American Fisheries Society», 120, pp. 121-126.
- MCDONALD G. & MILLIGAN L. (1992): *Properties of the blood*, in *Fish Physiology*, W.S.Hoar & D.J. Randall Eds. Academic Press, New York, XIIB, pp. 56-133.
- MOBERG G.P. (2000): *Biological response to stress: Implications for animal welfare*, in *The biology of animal stress*, Moberg, G.B. & Mench, J.A. Eds. CABI Publishing, pp 1-21.
- MORGAN J.D. & IWAMA G.K. (1997): *Measurements of stressed states in the field*, in *Fish stress and health in aquaculture*, G.K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter, C.B. Schreck Eds, Cambridge- University press, pp. 247-268.
- PANKHURST N.W. & SHARPLES D.F. (1992): *Effects of capture and confinement on plasma*

- cortisol concentrations in the snapper, Pagrus auratus*, «Austr. J. f. mar. and Freshw. Res.», 43, pp. 345-356.
- SARGENT J., BELL G., McEVOY L., TOCHER D., ESTEVEZ A. (1999): *Recent developments in the essential fatty acid nutrition in fish*, «Aquaculture», 177, pp. 191-199.
- TANAKA R., HIGO Y., SHIBATA T., SUZUKI N., HATATE H., NAGAYAMA K., NAKAMURA T. (2002): *Accumulation of hydroxy lipids in live fish infected with fish diseases*, «Aquaculture», 211, pp. 341-351.
- WENDELAAR BONGA S.E. (1997): *The stress response in fish*, «Physiol. Rew.», 77 (3), pp. 591-625.