

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Corso di laurea magistrale in ANALISI E GESTIONE DELL'AMBIENTE

**I residui dei farmaci come contaminanti dell'ambiente  
acquatico: effetti della fluoxetina sulla fisiologia del mitilo,  
*Mytilus galloprovincialis***

Tesi di laurea in Fisiologia applicata all'ambiente

Relatore

**Prof.ssa Elena Fabbri**

Presentata da

**Alessandro Mola**

Correlatore

**Dott.ssa Sara Buratti**

II sessione



## ***Sommario***

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
1.1 FARMACI IN AMBIENTE.....	7
1.1.1 SSRI <sup>s</sup> IN AMBIENTE.....	11
1.2 LA FLUOXETINA.....	12
1.3 REGOLAMENTAZIONI DELL'USO DEI FARMACI.....	15
1.4 SISTEMI DI DEPURAZIONE DELLE ACQUE.....	17
1.4.1 TECNICHE DI DEPURAZIONE.....	20
1.5 AZIONI DI MITIGAZIONE.....	23
1.6 GLI ORGANISMI SENTINELLA: <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	24
1.6.1 ASPETTI FISIologici E MORFO-FUNZIONALI.....	24
1.6.2 REGOLAZIONE OSMOTICA ED ESCREZIONE.....	26
1.6.3 APPARATO DigerENTE.....	26
1.6.4 ALIMENTAZIONE E DIGESTIONE.....	26
1.6.5 APPARATO RESPIRATORIO.....	27
1.6.6 APPARATO RIPRODUTTORE.....	27
1.6.7 APPARATO CIRCOLATORIO.....	28
1.7 I BIOMARKER.....	29
1.8 SISTEMA ESPERTO.....	35
<b>2. SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>37</b>
<b>3. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>42</b>
3.1. ESPOSIZIONE ORGANISMI ALLA FLUOXETINA.....	44
3.2 NEUTRAL RED RETENTION ASSAY.....	45
3.3 RAPPORTO LISOSOMI/CITOPLASMA.....	46
3.4 ACCUMULO DI LIPOFUSCINE.....	46
3.5 ACCUMULO DI LIPIDI NEUTRI.....	47
3.6 DETERMINAZIONE DELLA MALONDIALDEIDE (MDA).....	47

3.7PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER L'ANALISI DI CAT, GST e AChE.....	48
3.8 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA CATALASI.....	49
3.9 DETERMINAZIONE ATTIVITÀ DELLA GLUTATIONE S-TRANSFERASI .....	49
3.10 DETERMINAZIONE ATTIVITÀ DELL' ACETILCOLINESTERASI .....	49
3.11 DOSAGGIO PROTEINE .....	50
3.12 SISTEMA ESPERTO.....	51
3.13 ANALISI STATISTICA.....	53
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>55</b>
4.1 NEUTRAL RED RETENTION ASSAY.....	57
4.2 RAPPORTO LISOSOMI/CITOPLASMA.....	58
4.3 ACCUMULO DI LIPOFUSCINE.....	59
4.4 ACCUMULO DI LIPIDI NEUTRI.....	60
4.5 DETERMINAZIONE DELLA MALONDIALDEIDE (MDA).....	61
4.6 DETERMINAZIONE ATTIVITÀ DELLA CATALASI .....	62
4.6.1 CATALASI NELLE GHIANDOLE DIGESTIVE.....	62
4.6.2 CATALASI NELLE BRANCHE.....	63
4.7 DETERMINAZIONE ATTIVITÀ DELLA GLUTATIONE S-TRANSFERASI (GST).....	64
4.7.1 GST NELLE GHIANDOLE DIGESTIVE.....	64
4.7.2 GST NELLE BRANCHE.....	65
4.8 DETERMINAZIONE ATTIVITÀ DELL' ACETILCOLINESTERASI (AChE).....	66
4.8.1 AChE NELLE GHIANDOLE DIGESTIVE.....	66
4.8.2 AChE NELLE BRANCHE.....	67
4.9 SISTEMA ESPERTO.....	68
<b>5.DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....</b>	<b>70</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>79</b>



Cap.1  
INTRODUZIONE



## 1.1 FARMACI IN AMBIENTE

I farmaci ed i loro residui presenti in ambiente sono considerati contaminanti “emergenti”, il termine emergente non è utilizzato con un’accezione temporale in quanto è noto da almeno 20 anni che queste sostanze sono presenti in ambiente. Il termine “emergente” piuttosto è utilizzato per distinguerli dagli inquinanti convenzionali (ad es. metalli come mercurio, piombo, etc.) o da quelli che sono stati definiti ‘contaminanti prioritari’ (DDT, PCB, PAH, etc...) e sui quali è stata posta un’enorme attenzione da parte dell’opinione pubblica, delle associazioni ambientaliste e degli organi legislativi competenti (Daughton and Ternes, 1999). L’interesse da parte della comunità scientifica sugli effetti che tali sostanze hanno sugli organismi viventi ed i relativi rischi è diventato particolarmente rilevante nell’ultimo decennio, quando sono emersi chiaramente alcuni importanti effetti noti su scala mondiale. Fra i vari esempi citiamo la diminuzione della fertilità di alcune specie acquatiche esposte ai principi attivi della pillola anticoncezionale (Säfholm et al., 2012) oppure l’elevata mortalità di avvoltoi che si alimentavano di animali trattati con l’antiinfiammatorio diclofenac (Taggart et al., 2007).

I farmaci vengono inseriti in una vastissima classe di prodotti definita PPCPs (Pharmaceuticals and Personal Care Products) che racchiude anche i prodotti per la cura della persona quali shampoo, deodoranti e detersivi in genere (Boxall *et al.*, 2012). I residui di queste sostanze sono ubiquitari, ovvero presenti in tutti i comparti ambientali (suoli, acque di fiumi e laghi, acque marine, organismi animali, ecc...) a causa delle numerose fonti attraverso le quali contaminano l’ambiente: smaltimento improprio di farmaci scaduti o inutilizzati, utilizzo di farmaci in acquacoltura, industrie, fattorie, aziende ospedaliere e tanti altri. Tuttavia, la fonte principale di contaminazione da farmaci è rappresentata dai pazienti stessi; infatti i pazienti sottoposti a terapia assumono sostanze che in parte non vengono metabolizzate e vengono escrete come tali o sottoforma di metaboliti i quali raggiungono le acque fognarie, e in seguito i depuratori. Nella maggior parte dei

casi, i depuratori non sono in grado di degradare le molecole molto complesse presenti nei farmaci, che perciò si ritrovano nelle acque in uscita dai depuratori e di seguito nelle acque superficiali e costiere. Una volta raggiunto l'ambiente, un farmaco, a seconda delle sue caratteristiche può degradarsi o persistere a lungo ed interagire con gli organismi acquatici (Zuccato *et al.*, 2004).

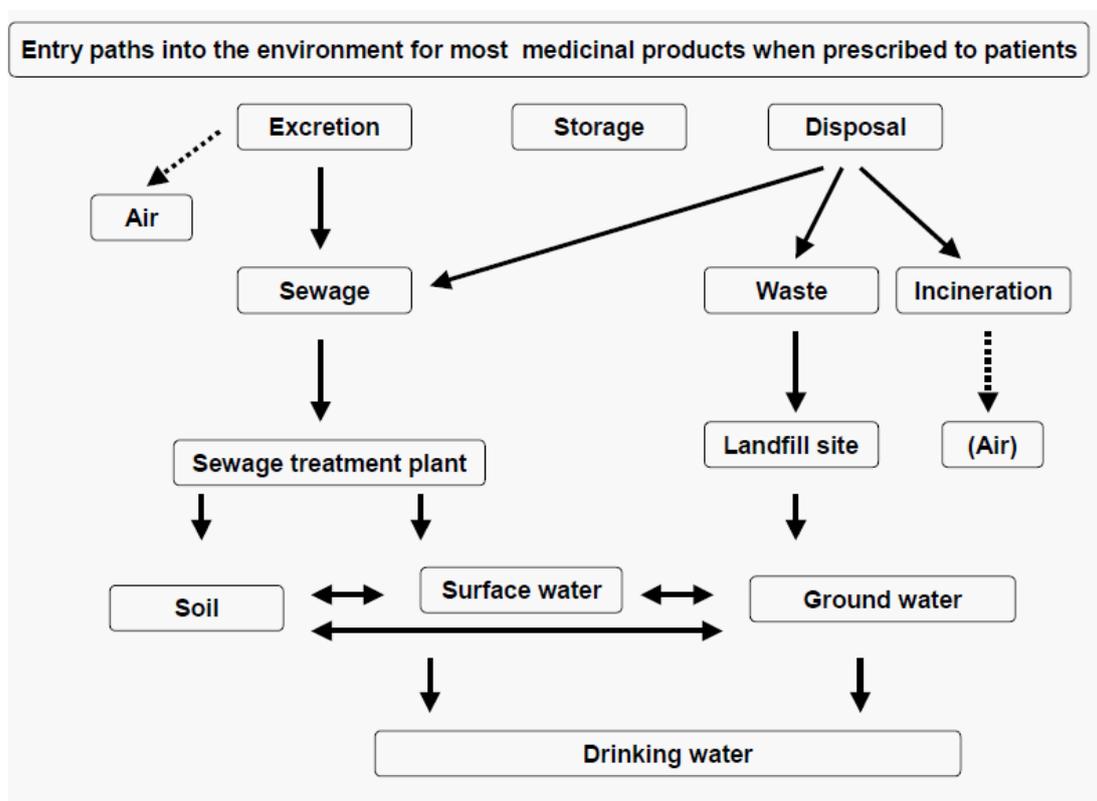
Tra queste sostanze sono da includere anche le droghe illecite, la cui scoperta in concentrazioni significative nelle acque superficiali ha determinato negli anni più recenti lo sviluppo di interesse da parte dell'opinione pubblica, oltre che dei laboratori scientifici. Escrete in larga misura come composti parentali ma anche come metaboliti, le droghe illecite raggiungono l'ambiente acquatico attraverso le acque reflue e rappresentano un potenziale rischio per il biosistema (vegetazione, animali). Dall'analisi della letteratura emerge che i residui di sostanze più abbondanti nelle acque reflue sono la benzoilecgonina e l'ecgonina metilestere (entrambi metaboliti della cocaina), la morfina, l'MDMA, metamfetamina, amfetamina. L'efficienza di rimozione da parte dei sistemi di depurazione dipende sia dalla concentrazione della droga che dalla sua natura molecolare e dei suoi metaboliti, numerose ricerche hanno riportato le percentuali di rimozione delle droghe più diffuse: cocaina (72-100%), benzoilecgonina (83-100%), norbenzoilecgonina (65%), anfetamine (52-99%), metanfetamine (44-99%), MDMA (44-57%), MDA (60%), morfina (72-98%), metadone (9-22%), EDDP (8-27%) e THC-COOH (11-99%) (Zuccato e Castiglioni, 2009; Bijlsma *et al.*, 2009; Loganathan *et al.*, 2009; Huerta-Fontela *et al.*, 2008a). In generale, è stato possibile realizzare una scala di efficienza di rimozione, espressa in ordine crescente: anfetamine e suoi composti < cannabinoidi < oppiacei < cocaina e metaboliti (Postigo *et al.* 2010). Numerosi studi sono stati condotti in diverse parti del mondo allo scopo di misurare i livelli di concentrazione di sostanze illecite nelle acque superficiali, tra i quali: Italia (Zuccato *et al.*, 2008, 2005), Germania (Hummel *et al.*, 2006), Irlanda (Ossa *et al.*, 2007), Regno Unito (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2008, 2009), Spagna (Huerta-Fontela *et al.*, 2008b, 2007; Boleda *et al.*, 2007, 2009; Vazquez-Roig *et al.*, 2010; Postigo *et al.*, 2010; González-Marino *et al.*, 2010; Bueno *et al.*, 2011; Valcárcel *et al.*, 2012), Belgio

(Gheorghe et al., 2008, Van Nuijs et al, 2009c, d), Svizzera (Berset et al, 2010), e negli Stati Uniti (Bartelt-Hunt et al., 2009). I valori stimati da queste pubblicazioni sono riportati nella tabella 1.1.

**Tabella 1.1 Concentrazione (ng/L) di droghe illecite misurate in diversi fiumi italiani e non (Pal et al., 2012).**

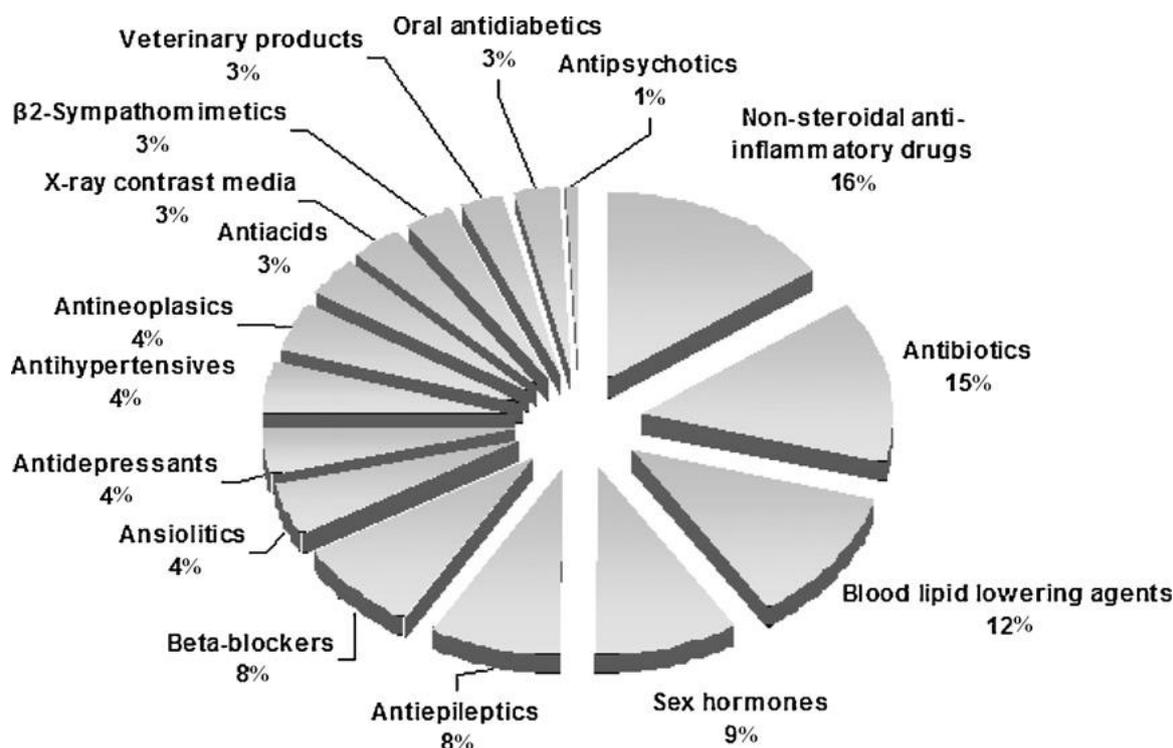
Compound	Country	Name of river	Study period	Concentration (ng L <sup>-1</sup> )	Compound	Country	Name of river	Study period	Concentration (ng L <sup>-1</sup> )			
Cocaine	Italy	Po	2004	1.2	Methadone	Spain	Llobregat	Mar-May 2007	6.4			
		Po	2006	0.5			Llobregat	2007	2.4			
		Olona	2006	44			Henares	Jun 2010	7			
		Lambro	2006	15			Tagus	Jun 2010	2.58 <sup>b</sup>			
		Arno	2006	1.7			Switzerland	Tagus	Mar 2010	1.7		
		Thames	Oct 2005	4.7		EDDP		Italy	Po	2006	1	
		Spain	Llobregat	May 2006-Apr 2007			23.8		Olona	2006	18	
	Llobregat		Sep 2006	6			Lambro		2006	9.9		
	Benzoyllecgonine	Spain	Llobregat	Apr 2008			0.5	Arno	2006	4.3		
				Ebro			Oct 2007-Jul 2008	1.4 <sup>b</sup>	Spain	Llobregat	Mar-May 2007	12.3
				Sar	30	Llobregat	2007	6.0				
				Henares	Jun 2010	44	Henares	Jun 2010		35		
				Belgium			Jun-Jul 2007	15.3	Tagus	Jun 2010	7.57 <sup>b</sup>	
		2007-2008	22.4				Switzerland	Mar 2010	4.9			
		2007-2008	11.9					Δ9-tetrahydrocannabinol	Po	2006	0.3	
UK		Taff		2	Lambro	2006	3.7					
				2	Arno	2006	0.5					
Ireland		Broadmeadow, Liffey		Nov 2006	29	Thames	Oct 2005		1			
	Mar 2010			0.4	Spain	Llobregat	Mar-May 2007		24			
Benzoyllecgonine	Italy	Po	2004	25		Ebro	Oct 2007-Jul 2008	5.5 <sup>b</sup>				
			2006	3.7								
			2006	183								
			2006	50								
			2006	21.8								
			Oct 2005	11.2								
	Benzoyllecgonine	Spain	Llobregat	May 2006-Apr 2007	64							
				Sep 2006	77							
				Apr 2008	7.4							
				Oct 2007-Jul 2008	11.4 <sup>b</sup>							
				316								
		Belgium			Jun 2010	142						
					Jun 2010	29.2 <sup>b</sup>						
					Jun-Jul 2007	96						
					2007-2008	84						
2007-2008					48.5							
Germany	Rhine, Mosel, Lahn	Mar and Nov 2005	3 <sup>b</sup>									
UK	Taff		85									
			55									
			12									
Switzerland			Mar 2010	1.6								
			1.6									
			1.6									
Norbenzoyllecgonine	Italy	Po	2006	0.3								
			2006	8.4								
			2006	3.2								
			2006	1.6								
			2006	1.6								
Norcocaine	Spain	Tagus	Jun 2010	7.39 <sup>b</sup>								
			2006	3.6								
			2006	0.4								
Cocaethylene	Italy	Arno	2006	0.1								
			2006	1.3								
			2006	0.2								
Morphine	Spain	Ebro	Oct 2007-Jul 2008	0.3 <sup>b</sup>								
			2006	38								
			2006	3.5								
	Morphine	Italy	Arno	2006	3							
				Oct 2005	15.8							
				Germany	Rhine, Saar, Mosel, Lah	Mar and Nov 2005	10 <sup>b</sup>					
				Spain	Llobregat	Mar-May 2007	5.5					
						Apr 2008	6.0					
						2007	4.1					
						Oct 2007-Jul 2008	9.8 <sup>b</sup>					
Morphine			Sar	89								
			Jun 2010	16								
			Jun 2010	1.74 <sup>b</sup>								
Methadone	Switzerland	Tagus	Mar 2010	2.2								
			2.2									
			2.2									
			2.2									
			2.2									
Methadone	Italy	Po	2006	0.5								
			2006	8.6								
			2006	3.4								
			2006	4.8								

Per quanto riguarda i farmaci usati per scopi terapeutici nella medicina umana, lo schema sottostante pubblicato dalla EMEA (European Medicinal Evaluation Agency) nel 2006, riassume le fonti di emissione ed i relativi comparti ambientali nei quali avviene la dispersione. Le pratiche principali che causano la dispersione in ambiente sono: l'escrezione in seguito a somministrazione, lo stoccaggio e lo smaltimento. Mentre i bersagli dove si ha accumulato in seguito al trasporto legato a vari vettori, come detto in precedenza, sono i suoli, le acque sotterranee e le acque superficiali ed in alcuni casi le acque potabili.



**Figura1.1 Destino dei farmaci in ambiente (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA CHMP. 2006)**

I farmaci maggiormente diffusi in ambiente, in particolare nelle acque superficiali, sono quelli di automedicazione (ibuprofene e aspirina), gli antibiotici (sulfonamidi e macrolidi), medicinali regolatori di colesterolo e lipidi (colifibrati e statine),  $\beta$ -bloccanti (propranololo), farmaci neuroattivi (caffaina, carbamazepina, fluoxetina e morfina), e una serie di altri composti (Daughton and Ternes, 1999; Fent et al., 2006).



**Figura 1.2 Farmaci rilevati in ambiente, suddivisi in classi, espressi in percentuale (Santos *et al.*, 2010).**

Nella figura 1.2 sono rappresentate le categorie di farmaci maggiormente presenti in ambiente, tra i quali possiamo menzionare gli antidepressivi (4%), ovvero la classe di appartenenza della Fluoxetina, il farmaco oggetto del seguente studio che, in particolare, fa parte di una sottoclasse detta SSRIs (Selective Serotonin Re-uptake Inhibitors).

### 1.1.1 SSRIs IN AMBIENTE

Gli SSRIs (Inibitori selettivi della ri-captazione della serotonina) sono stati ampiamente commercializzati dalla metà degli anni '80 per la cura di pazienti affetti da depressione, disturbi ossessivo-compulsivi, panico, fobia sociale e disturbo da deficit di attenzione (Schultz e Furlong, 2008). I medicinali appartenenti a questa classe sono fluoxetina (FXT), antidepressivo di prima generazione ma ancora molto usato, e i più recenti citalopram (CIT), paroxetina (PAR), sertralina

(SER) e fluvoxamina (FLX) ed altri (Kosjek e Heath, 2010). Si tratta di farmaci neuroattivi molto utilizzati e di conseguenza molto diffusi in ambiente acquatico. I dati di cui si dispone riguardano la presenza di tali molecole nelle acque superficiali e sotterranee e sono riportati nella Tabella 1.2.

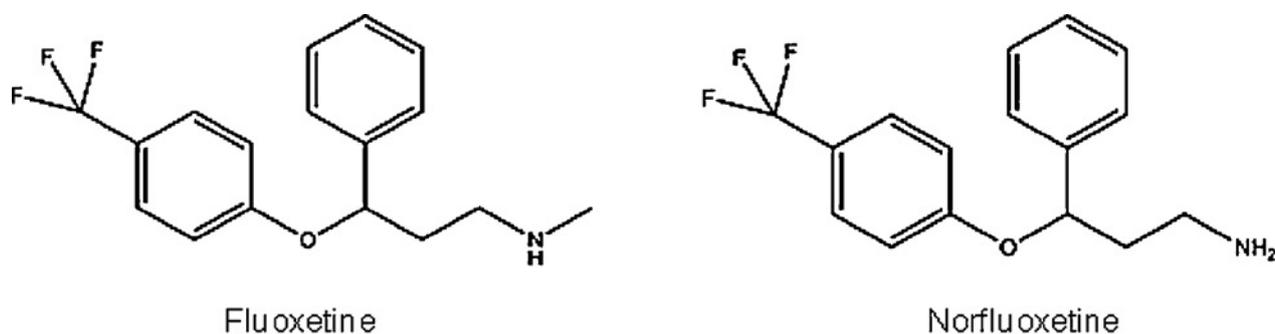
**Tabela 1.2 Presenza di SSRI e loro metaboliti nelle acque di fiumi, laghi, ambiente marino costiero e acque sotterranee. I dati sono provenienti da diversi Paesi. (Silva et al., 2012).**

Country	SSRI	Sample type	Concentration reported (ng L <sup>-1</sup> )	Country	SSRI	Sample type	Concentration reported (ng L <sup>-1</sup> )		
Canada	Fluoxetine	Hamilton Harbor	13–46	India	Citalopram	Surface water	2000–8000		
		Little River				Isakavagu–Nakkavagu Rivers	40–7600		
	Citalopram	St. Lawrence River	3.4–11.5	USA	Fluoxetine	Surface water	12		
	Fluoxetine		0.42–1.3			Citalopram	Surface water	5.7–63.7	
	Norfluoxetine		1.2–1.3			Fluoxetine	water	5.6–48	
	Paroxetine		1.3–3			Fluvoxamine		3.7	
	Sertraline		0.84–2.4			Paroxetine		1.6	
	Desmethylsertraline		2.3–4.5			Sertraline		1.1–34.9	
	Citalopram	Grand river	4–206			Norfluoxetine		3.2–31.7	
	Desmethylcitalopram		8–110			Desmethylsertraline		12.5–61.9	
	Sertraline		6–17			Fluoxetine	Surface water	12–20	
	Desmethylsertraline		0.005			Norfluoxetine		0.83–1	
	Fluoxetine		4–141			Sertraline		33–49	
Norfluoxetine		4	Desmethylsertraline				3–7		
Norway	Fluvoxamine	Seawater	0.5–0.8			Paroxetine		2.1–3	
			0.6–1.4	Citalopram		40–90			
Spain	Fluoxetine	Ebro River	<0.16	Fluoxetine	Groundwater	56			
			Citalopram	Jarama River	3–43	Paroxetine	Surface water	90	
				Manzanares River	58		Fluoxetine	Surface water	<0.5–43.2
				Guadarrama River	13–120		Norfluoxetine	water	<0.5–13.6
				Henares River	–		Sertraline		<0.5–37.5
				Tajo River	–		Desmethylsertraline		1.1–26.7
			Fluoxetine	Jarama River	13–16	Paroxetine		<0.5–5.79	
				Manzanares River	22	Citalopram		<0.5–219	
				Guadarrama River	8–44	Fluvoxamine		<0.5–4.6	
				Henares River	11				
			Sertraline	Llobregat River	Tajo River	12			
						11			

## 1.2 LA FLUOXETINA

La fluoxetina è un farmaco antidepressivo messo in commercio quasi venti anni fa dalla Eli Lilly, come principio attivo del Prozac, uno dei farmaci maggiormente prescritti ed utilizzati per il trattamento della depressione, disturbi ossessivo-compulsivi, disturbi nell'alimentazione, panico e ansia. Essendo un SSRI, il suo meccanismo d'azione consiste nell'inibire il reuptake della

serotonina. La fluoxetina agisce principalmente sul sistema nervoso centrale inibendo selettivamente una proteina carrier nella membrana pre-sinaptica responsabile del re-uptake della serotonina; questa azione produce un aumento della concentrazione del neurotrasmettitore serotonina (5-idrossitriptamina [5-HT]), nella fessura sinaptica con il risultato di aumentare l'interazione del neurotrasmettitore stesso con i recettori post-sinaptici. La fluoxetina e tutti gli SSRI sono detti non-triciclici e hanno una bassa affinità per i trasportatori di altri neurotrasmettitori (ad esempio la colina), e di conseguenza hanno una minore incidenza di effetti collaterali gravi (es: cardi tossicità) rispetto ad altre sostanze psicotrope come gli antidepressivi triciclici (Oakes, D.K. *et al.*, 2010). Dopo il consumo, la fluoxetina viene metabolizzata a norfluoxetina anch'essa in grado di agire come inibitore selettivo del reuptake della serotonina con lo stesso meccanismo d'azione della fluoxetina (Fuller *et al.*, 1992).



**Figura 1.3 Struttura della Fluoxetina e della Norfluoxetina (Kosjek and Heath, 2010)**

Fluoxetina e norfluoxetina (Fig. 1.3) vengono poi escrete dall'organismo principalmente attraverso l'urina (Altamura *et al.*, 1994; Hiemke and Härtter, 2000) e terminano in ambiente a causa della scarsa capacità dei depuratori di eliminarli dalle acque reflue urbane e ospedaliere (Kolpin *et al.*, 2002; Vassog *et al.*, 2008). Le concentrazioni di SSRI riscontrate in acque superficiali, sotterranee e potabili sono riportate in Tabella 1.3.

**Tabella 1.3 Concentrazioni (ng/L) di fluoxetina e norfluoxetina in differenti ambienti acquatici (Santos *et al.*, 2010).**

Compound	CAS number	Sample	Country	Analytical procedure	LOD (ng L <sup>-1</sup> )	Concentration reported (ng L <sup>-1</sup> )
Fluoxetine	54910-89-3	Surface water	USA	SPE-LC-MS	18	12
Fluoxetine		Groundwater	USA	SPE-HPLC-MS	18	56
Fluoxetine		Drinking water	USA	SPE-LC-MS/MS	0.50	0.64
Fluoxetine		STP effluent	South Korea	SPE-LC-MS/MS	1.0	1.7
Fluoxetine		Surface water				ND
Fluoxetine		STP influent	Norway	SPE-HPLC-MS	0.12	0.4–2.4
Fluoxetine		STP effluent				<0.12–1.3
Fluoxetine		STP influent	Norway	HF-LPME-HPLC-MS	0.15	1.1 (±22.9)–18.7 (±0.9)
Fluoxetine		STP effluent				0.6 (±20.0)–8.4 (±22.9)
Fluoxetine		STP influent	Canada	SPE-LC-MS/MS	0.05	3.1 (±0.3)–3.5 (±0.3)
Fluoxetine		STP effluent				2.0 (±0.1)–3.7 (±0.1)
Fluoxetine		St. Lawrence River water				0.42 (±0.01)–1.3 (±0.1)
Norfluoxetine*	83891-03-6	Drinking water	USA	SPE-LC-MS/MS	0.50	0.77
Norfluoxetine*		STP influent	Norway	HF-LPME-HPLC-MS	0.16	0.7 (±13.1)–9.3 (±4.6)
Norfluoxetine*		STP effluent			0.54 (LOQ)	<0.54–2.4 (±14.5)
Norfluoxetine*		STP influent	Canada	SPE-LC-MS/MS	0.087	1.8 (±0.3)–4.2 (±0.5)
Norfluoxetine*		STP effluent				1.7 (±0.1)–1.8 (±0.3)
Norfluoxetine*		St. Lawrence River water				1.2 (±0.1)–1.3 (±0.1)

La serotonina è il mediatore di numerose funzioni fisiologiche in tutti i vertebrati ed anche nei molluschi; in questi ultimi essa regola i processi riproduttivi tra cui la maturazione degli oociti (Fong *et al.*, 1994; Hirai *et al.*, 1988), la deposizione dei gameti (Hirai *et al.*, 1988; Ram *et al.*, 1993) e la schiusa delle uova (Fong *et al.*, 1996). Infatti, la serotonina, la fluoxetina e altri inibitori selettivi del reuptake della serotonina (SSRIs) sono utilizzati per indurre artificialmente la deposizione delle uova in acquacoltura (Cunha and Machado, 2001; Gibbons and Castagna, 1984).

### 1.3 REGOLAMENTAZIONI DELL'USO DEI FARMACI

Le prime misure di regolamentazione riguardanti la fabbricazione, l'utilizzo e il commercio di farmaci nei paesi della Comunità Europea risalgono al 2001. Il primo documento in materia è rappresentato dalla direttiva europea 2001/83/EC emanata dal parlamento europeo il 6 novembre 2001 con la quale si introduce un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano. Qualche anno dopo, si ha l'introduzione della valutazione dell'esposizione ambientale ai farmaci veterinari e le procedure di valutazione del rischio legato a tale esposizione (2004/27/EU). Queste direttive prescrivono che la valutazione del rischio entri a far parte della procedura di approvazione dei nuovi farmaci (Martin-Diaz et al., 2009). Successivamente, nel 2006 per la prima volta viene esteso ai farmaci ad uso umano il concetto di 'valutazione del rischio ambientale', ERA (Environmental Risk Assessment), come riportato nelle *"Guidelines on the environmental risk assessment of medicinal products for human use"* un documento redatto dall' EMEA (European Medicinal Evaluation Agency) che descrive il procedimento di valutazione cui sottopone i nuovi farmaci precedentemente alla loro immissione in commercio. E' una valutazione multistep (Tabella 1.4) che si conclude nel momento in cui sia dimostrata la non-pericolosità ambientale del farmaco, e ne permette il rilascio dell'autorizzazione alla vendita. Qualora non fosse possibile escludere totalmente un eventuale rischio per l'ambiente, l'autorizzazione viene rilasciata con alcune riserve che consistono in etichettature particolari o avvisi di potenziale dannosità per l'ambiente da includere nella documentazione allegata al farmaco (fogli illustrativi). Tuttavia, nel caso in cui sia riconosciuta una certa pericolosità ambientale di uno specifico farmaco, non si procede alla sua eliminazione ma solo alla prescrizione di alcune misure di mitigazione da attuare durante lo stoccaggio, la somministrazione ai pazienti e lo smaltimento. Occorre precisare che le prescrizioni previste dall'EMEA riguardano solo i farmaci "nuovi" vale a dire quelli il cui brevetto è successivo all'emanazione delle linee guida e non è contemplata alcuna misura per i farmaci già esistenti sul

mercato (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA CHMP. 2006. CHMP/SWP/4447/00).

**Tabella 1.4 Fasi dell' environmental risk assessment per i farmaci ad uso umano (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA CHMP. 2006)**

Stage in regulatory evaluation	Stage in risk assessment	Objective	Method	TEST / DATA REQUIREMENT
Phase I	Pre-screening	Estimation of exposure	Action limit	Consumption data, logKow.
Phase II Tier A	Screening	Initial prediction of risk	Risk Assessment	Base set aquatic toxicology and fate
Phase II Tier B	Extended	Substance and compartment-specific refinement and risk assessment	Risk Assessment	Extended data set on emission, fate and effects

Nel corso degli anni, l'attenzione nei confronti del potenziale inquinante dei farmaci è aumentata notevolmente e l'EMA si è impegnata a facilitare l'utilizzo delle linee guida sulla valutazione del rischio ambientale. In particolare, in una pubblicazione del 2010: " Questions and answers on 'Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use'" (EMA/CHMP/SWP/44609/2010), l'agenzia europea si pone l'obiettivo di fornire chiarimenti e di snellire l'applicazione delle 'Linee guida sulla valutazione del rischio ambientale dei medicinali per uso umano' (EMA/CHMP/SWP/4447/00) da parte delle case farmaceutiche, specificando i casi e le modalità di applicazione del procedimento di valutazione (ERA).

Tuttavia, nonostante i numerosi sforzi da parte delle autorità competenti a livello comunitario e nazionale, attualmente, si è ancora molto lontani da un approccio ecocompatibile al commercio e all'utilizzo dei farmaci per svariati motivi, sia comportamentali che economici. Infatti, gli interessi economici delle industrie farmaceutiche sono tali da far passare in secondo piano la questione

ambientale e, oggi giorno, sono pochissimi gli Stati, a livello europeo e mondiale, in grado di classificare e favorire l'impiego di farmaci in base alla loro sostenibilità ambientale.

Inoltre, un'altra lacuna fondamentale nella legislazione, riguarda il farmaco nel suo 'status' di inquinante nel senso che non esistono linee guida sulle tecniche di misura dei farmaci presenti in acqua e non esistono limiti di legge sulle concentrazioni oltre le quali un'acqua può essere dichiarata contaminata da farmaci, a differenza di quanto avviene per molti altri contaminanti (metalli, nitriti, nitrati, PCB, DDT ecc...). Ciò è dovuto principalmente a due motivi: il primo è di carattere tecnico e consiste nella difficoltà che si incontra nel dosare molecole spesso presenti in concentrazioni bassissime con le metodiche attuali, mentre il secondo, di carattere tossicologico, risiede nel non avere prove sufficienti che affermino una reale tossicità sull'uomo da parte dei farmaci dispersi in ambiente. A causa di questi impedimenti, le analisi di acque destinate all'irrigazione o al consumo umano, attualmente, non contemplano alcuna indagine sulla tipologia e sulle concentrazioni di farmaci presenti. Ciò significa che per molti anni ancora saranno impiegate, per gli usi più comuni, delle acque che con molta probabilità contengono farmaci in quantità più o meno modeste e potenzialmente dannose.

#### **1.4 SISTEMI DI DEPURAZIONE DELLE ACQUE**

Riprendendo il discorso accennato in precedenza, abbiamo visto che la principale modalità di dispersione avviene attraverso l'escrezione del farmaco assunto e dei suoi metaboliti da parte dell'uomo; la percentuale di sostanza che non viene metabolizzata è variabile, talvolta si può avere un'escrezione di più del 90% del farmaco (Halling-Sørensen *et al.*, 1998), che raggiunge le acque fognarie e successivamente i depuratori. Alcuni farmaci possono essere degradati durante il trattamento delle acque reflue, altri non subiscono alcuna trasformazione e restano disciolti in acqua o assorbiti nella fase solida che poi verrà separata e rimossa da quella liquida. In molti casi, i

prodotti ottenuti dalla degradazione delle molecole possono essere più mobili o persistenti di quanto non lo siano i loro composti di partenza (Aga, 2008). In generale, l'efficacia di rimozione dei farmaci dalle acque è estremamente variabile e dipende sia dalle caratteristiche dell'impianto, ovvero dalle condizioni generali di funzionamento, tecnologia utilizzata, composizione della comunità microbica e altri fattori chimico-fisici, che dalla tipologia e complessità della molecola che dovrà essere degradata (Khanal et al., 2006; Radjenovic et al., 2009; Suarez et al., 2008).

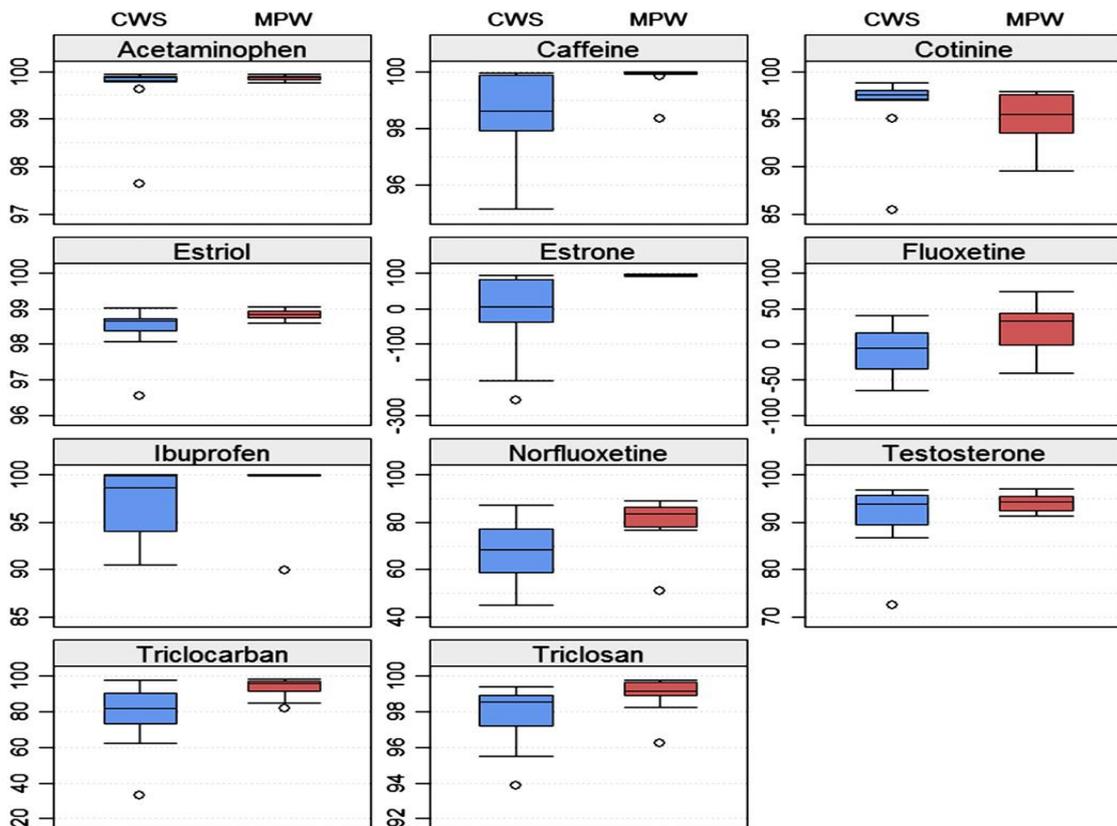
I farmaci sono prodotti organici di sintesi, destinati a produrre una specifica risposta molecolare, raggiungendo il sito specifico di azione all'interno dell'organismo e per farlo richiedono una certa stabilità chimica. Questa stabilità metabolica li rende difficilmente rimovibili con i trattamenti delle acque reflue e può inoltre causare la formazione di metaboliti. Pertanto, è possibile che un farmaco non venga rilevato in un effluente di un depuratore, ma non perché che sia stato completamente rimosso. In alcuni casi, infatti, lo si può ritrovare in una forma ossidata o sotto forma di composti differenti, talvolta più efficaci del farmaco parentale. Un esempio può essere la formazione di norfluoxetina a partire dalla fluoxetina (Silva et al., 2012).

Inoltre, un aspetto da non sottovalutare, evidenziato solo di recente, risiede nei differenti destini ambientali e nella differente tossicità degli enantiomeri dei composti chirali. È stata, infatti, riscontrata una differenza nelle concentrazioni degli enantiomeri tra gli affluenti e gli effluenti di un depuratore dovuta alle modifiche molecolari indotte dai trattamenti biologici. Ciò è stato dimostrato monitorando un impianto di trattamento canadese in cui è stato trovato che la concentrazione relativa di (R)-FLX (enantiometro della fluoxetina) era presente in concentrazione maggiore 'a monte' che 'a valle' di un impianto di depurazione di acque reflue. Tuttavia, la maggior parte delle pubblicazioni sui farmaci in ambiente non tiene conto degli aspetti relativi alla loro chiralità per cui non ne determina le concentrazioni relative ad ogni enantiometro (Barclay et al., 2011).

Una dimostrazione pratica della differente efficienza di degradazione delle sostanze farmaceutiche dalle acque reflue è fornita da un recentissimo studio svolto negli Stati Uniti e pubblicato nel luglio

2012 che si è occupato di analizzare i PPCPs presenti nelle acque reflue trattate da due impianti di depurazione e scaricate nel porto di Charleston in South Carolina, dal quale si deduce la variabilità dell'efficienza di rimozione.

Di seguito è riportata graficamente (Fig.1.4) la percentuale di rimozione di undici diverse sostanze trattate dai due impianti di trattamento analizzati nel caso studio, il primo individuato con la sigla CWS, è un impianto di dimensioni notevoli (portata media di circa 20 milioni di galloni/giorno) ed utilizza metodi di trattamento convenzionali di tipo primario (meccanico-fisici) e secondario (chimico-biologici) e scarica gli effluenti previa disinfezione con ipoclorito di sodio. Il secondo, individuato con la sigla MPW, è un impianto di portata inferiore (circa 5,1 milioni di galloni/giorno) dotato di tecnologie più avanzate, infatti oltre alle strutture per i trattamenti convenzionali, è presente anche un bacino anossico di sedimentazione (trattamento terziario).



**Figura 1.4: percentuale di rimozione di analiti durante i trattamenti di depurazione (Hedgspeth et al., 2012).**

Dai grafici si notano le differenti percentuali di rimozione tra le acque in uscita dal depuratore di tipo tradizionale (colonne azzurre) e quelle in uscita dal depuratore di concezione moderna (colonne rosse), in particolare si notano dei risultati migliori nella rimozione di tutte le sostanze nei reflui del secondo depuratore. Notevole è inoltre la variabilità riscontrata tra i risultati relativi alle differenti sostanze trattate dallo stesso depuratore: alcune di esse mostrano una buona percentuale di rimozione come la caffeina, l'estrone e l'ibuprofene con una percentuale di rimozione pari circa al 100% in entrambi gli impianti, altre quali la fluoxetina mostrano una percentuale pari allo 0% nel depuratore tradizionale e inferiore al 50% nell'altro impianto. Risulta interessante evidenziare un altro aspetto riguardante il metabolita norfluoxetina che risulta decisamente più semplice da degradare rispetto al composto parentale fluoxetina.

Sono disponibili numerosi dati sulla presenza di farmaci appartenenti alla classe dei SSRIs in ambiente. Di seguito sono pubblicati i valori di concentrazione di SSRIs negli affluenti ed effluenti di alcuni impianti di depurazione di acque reflue siti in diversi Paesi (Tabella 1.5). I dati sono stati ricavati da articoli pubblicati tra il 2003 ed il 2011.

#### **1.4.1 TECNICHE DI DEPURAZIONE**

Quanto detto finora dimostra che pochi farmaci sono rimossi in maniera efficace dai depuratori cosiddetti tradizionali che dispongono di soli due sistemi di depurazione, primario e secondario. Sarebbe necessaria l'introduzione di un ulteriore step di depurazione, detto "terziario", che comprende processi innovativi di tipo chimico, come l'ozonazione, o di tipo fisico, come le membrane microfiltranti, diretto alla rimozione di inquinanti persistenti e complessi come i farmaci (Huber M. *et al.*, 2003). I principali meccanismi coinvolti nella rimozione dei farmaci sono la biodegradazione (ad esempio, l'ossidazione, idrolisi, demetilazione, scissione di glucuronati), l'assorbimento di fanghi o di particolato (da interazioni idrofobe o elettrostatiche), la filtrazione e l'ossidazione chimica (Miege et al., 2009). L'efficienza di tali meccanismi è profondamente legato

alle proprietà fisico-chimiche dei farmaci. Pertanto, è possibile stimare dei tassi di eliminazione che dipendono dalla tecnologia utilizzata in ogni stabilimento (Ternes 1998; Stumpf et al, 1999; Lindqvist et al, 2005). L'adeguatezza dei processi di trattamento distinti per l'eliminazione di farmaci dipende da molti fattori, secondo alcuni autori risultano determinanti: il tempo di ritenzione dei fanghi (SRT) (Zabczyński et al., 2010) e Il tempo di ritenzione idraulica (HRT) (Miege et al., 2009). Infatti, un valore di HRT e SRT alto permette lo svolgimento di reazioni quali la biodegradazione e la realizzazione di meccanismi di assorbimento (Miege et al., 2009). Alcune tecniche considerate efficaci per la rimozione dei farmaci possono essere l'ossidazione biologica con fanghi attivi contenenti azoto o fosforo oppure la rimozione mediante bioreattore a membrana (MBR, che consiste in un trattamento prolungato con fanghi seguito da una fase di filtrazione) (Miege et al., 2009). Le tecniche maggiormente applicate per la degradazione di inquinanti organici recalcitranti come i prodotti farmaceutici in acqua, possono essere di tipo biologico come bioreattori a membrana (MBR), o metodi fisico-chimici quali i processi di ossidazione avanzata (AOP), adsorbimento su carbone attivo (GAC), trattamento con membrana applicando la nanofiltrazione (NF) o osmosi inversa (RO). Questi processi di trattamento possono eliminare tali sostanze inquinanti completamente attraverso la mineralizzazione o convertirli in prodotti che sono meno nocivi per la salute umana e per l'ambiente acquatico. La tecnologia più promettente che ha il maggior margine di sviluppo è di tipo microbiologico ed è rappresentata dai Bioreattori a membrana (MBR), costituiti dalla combinazione di un processo biologico a fanghi attivi e una separazione solido-liquido mediante filtrazione su membrana (Tambosi et al., 2010).

Per quanto riguarda la Fluoxetina, contenendo ammine alifatiche secondarie (ed un  $pK_a=10,05$ ) può reagire rapidamente con il Cloro. Infatti, durante i processi di Clorazione (procedimento maggiormente utilizzato per la depurazione microbiologica delle acque) si ha formazione di N-clorammine. Le clorammine sono considerate composti "attivi" del cloro e sono persistenti nelle acque reflue in quanto stabili nelle soluzioni acquose. Solitamente per ridurre l'immissione in

ambiente di questi residui attivi del Cloro, si effettua una Dechlorurazione. È stata studiata in laboratorio la reattività delle ammine provenienti dalla Fluoxetina farmaceutica con ipoclorito di sodio simulando le condizioni tipiche di una disinfezione delle acque reflue (pH neutro, un intervallo di tempo di reazione di 2-60 min, e un eccesso molare di ipoclorito, rispetto alla concentrazione farmaceutica).

**Tabella 1.5 Presenza di SSRI e loro metaboliti (espresso in ng/L) negli affluenti ed effluenti di depuratori in diversi paesi. (Silva et al., 2012).**

Country	SSRI	Sample type	Concentration reported (ng L <sup>-1</sup> )	Country	SSRI	Sample type	Concentration reported (ng L <sup>-1</sup> )	
Austria	Citalopram	WWTP effluent	44-322			WWTP effluent	<0.49-0.8	
Canada	Fluoxetine	WWTP effluent	50-99		Paroxetine	WWTP influent	2.9-12.9	
	Citalopram	WWTP influent	307			WWTP effluent	1.0-11.7	
		WWTP effluent	207		Sertraline	WWTP influent	8.4-19.8	
	Fluoxetine	WWTP influent	18			WWTP effluent	3.7-14.6	
		WWTP effluent	14	Portugal	Fluoxetine	WWTP influent	<17-3645	
	Citalopram	WWTP influent	52.2-52.7			Escitalopram	WWTP influent	<27-39.732
		WWTP effluent	46.8-57.8			Paroxetine	WWTP influent	<14-32.228
	Fluoxetine	WWTP influent	3.1-3.5		Fluoxetine	WWTP influent	<5	
		WWTP effluent	2-3.7			WWTP effluent	<4	
	Norfluoxetine	WWTP influent	1.8-4.2		Paroxetine	WWTP influent	45-105	
		WWTP effluent	1.7-1.8			WWTP effluent	60-240	
	Paroxetine	WWTP influent	4.6-5.3	South Korea	Fluoxetine	WWTP effluent	1.7	
		WWTP effluent	4.3-5.2		Spain	Citalopram	WWTP effluent	340
	Sertraline	WWTP influent	6-6.1			Fluoxetine	WWTP effluent	19-929
		WWTP effluent	5.1-5.8		Paroxetine	Hospital effluent	1141	
	Desmethylsertraline	WWTP influent	4.2-5		Fluoxetine	WWTP influent	4-100	
		WWTP effluent	3.6-4.7			WWTP effluent	26	
	Citalopram	WWTP influent	136-223	USA	Fluoxetine	WWTP effluent	16	
	Desmethylcitalopram	WWTP influent	104-133			Fluoxetine	WWTP effluent	40-73
	Sertraline	WWTP influent	14-34			Paroxetine	effluent	13
		WWTP effluent	3-21		Sertraline	Healthcare facility	57-87	
	Fluoxetine	WWTP influent	20-91		Fluoxetine	wastewater	42-180	
	Norfluoxetine	WWTP influent	11		Paroxetine		28	
India	Citalopram	WWTP effluent	430		Sertraline		78-120	
Norway	Citalopram	WWTP influent	13.0-612					
		WWTP effluent	9.2-382					
	Fluoxetine	WWTP influent	0.4-2.4					
		WWTP effluent	<0.12-1.3					
	Fluvoxamine	WWTP influent	0.4-3.9					
		WWTP effluent	<0.15-0.8					
	Citalopram	WWTP influent	62.9-303.6					
		WWTP effluent	21.9-238.4					
	Fluoxetine	WWTP influent	1.1-18.7					
		WWTP effluent	0.6-8.4					
	Fluvoxamine	WWTP influent	0.8-1.7					

I risultati di tali studi dimostrano che i cationi della fluoxetina sono suscettibili alla rapida trasformazione in N-clorammine durante la disinfezione delle acque reflue. La reattività del N-clorammine è stata anche studiata con solfito per simulare i processi di dechlorurazione e si è visto che le N-clorammine reagiscono molto lentamente con solfito. Per cui sarebbero richiesti tempi molto lunghi per ottenerne una rimozione efficace. Negli impianti di depurazione, i trattamenti di Dechlorurazione hanno una durata nell'ordine di secondi, il che suggerisce che le clorammine formate a partire dalla Fluoxetina possono eludere facilmente la dechlorazione ed essere rilasciati nell'ambiente (Bedner and MacCrehan, 2006).

## **1.5 AZIONI DI MITIGAZIONE**

Grazie agli studi effettuati negli ultimi anni sull'immissione nell'ambiente di migliaia di differenti sostanze chimiche, tra cui i farmaci, si è giunti ad una notevole consapevolezza sui rischi correlati a tale fenomeno. Una dimostrazione evidente dell'acquisizione di tale consapevolezza si è avuta dalla Marine Strategy Framework Directive (2006), la direttiva quadro della comunità europea sulla qualità delle acque che contempla anche i farmaci tra i contaminanti che possono provocare impatti o pressioni ambientali. Le azioni di mitigazione sulla contaminazione da farmaci principalmente basati sulla produzione e commercializzazione viaggiano parallelamente al miglioramento tecnologico degli impianti di depurazione descritto nei precedenti paragrafi. Una testimonianza risiede nella nascita dei concetti di “green chemistry” e “green pharmacy”. La “green pharmacy” riguarda la nascita di una farmaceutica più ecocompatibile, che tenga conto anche dei risvolti ambientali di ciò che produce. Una delle azioni di mitigazione è proprio la sensibilizzazione delle case farmaceutiche alla produzione di farmaci con concentrazioni di principio attivo ridotte rispetto a quelle attuali, in modo da limitare la quantità di molecole non metabolizzate escrete dall'organismo. Oppure ridurre le quantità di farmaci presenti in ogni confezione, così da diminuire i volumi di farmaci inutilizzati da smaltire (Daughton et al., 2003). Un esempio concreto si è avuto

in Svezia, dove lo Stockolm County Council and Apoteket e lo Swedish Chemicals Inspectorate hanno messo a punto un modello per la classificazione dei farmaci in base alle loro caratteristiche ecotossicologiche. Ne è derivato un opuscolo in cui tutti i principali farmaci utilizzati in Svezia sono stati classificati in base alla loro azione e, secondariamente, in base ai rischi ambientali correlati al loro utilizzo per mettere in condizione i medici di prescrivere il farmaco più ecocompatibile a parità di costo ed efficacia (Stockolm County Council. Environmentally classified pharmaceuticals, 2006).

## **1.6 GLI ORGANISMI SENTINELLA: *Mytilus galloprovincialis***

I mitili (Fig. 1.5) sono molluschi che vivono in comunità molto numerose, attaccate a substrati duri per mezzo del bisso, che permette un'ottima adesione a qualsiasi tipo di substrato duro. I mitili presenti nelle nostre acque prosperano e raggiungono dimensioni commerciali solo in condizioni particolari, quasi sempre in lagune e laghi costieri, con salinità compresa tra il 28 e il 34‰, quella ottimale si aggira tra il 27 e il 30‰. Secondo comuni ma errate credenze, la cozza prospera bene solo nelle acque inquinate da scarichi fognari, traendo alimento dalla carica batterica delle acque. In realtà, l'inquinamento arreca agli organismi molti più svantaggi che vantaggi, ed è causa molto spesso di epidemie massive tra le stesse. Il mitilo è comunque un animale filtratore, il cui alimento principale è costituito da plancton e particelle organiche in sospensione.

### **1.6.1 ASPETTI FISIOLÓGICI E MORFO-FUNZIONALI**

Fra gli organismi marini maggiormente utilizzati in acquacoltura, questi bivalvi sono un esempio particolarmente evidente di adattamento strutturale e fisiologico all'ambiente. La conchiglia dei bivalvi, come indica il loro stesso nome, è composta da due valve generalmente simmetriche, una destra e una sinistra, separate dai relativi lobi del mantello e destinate a proteggere le viscere. Esse sono unite da un legamento e una cerniera, e sono costituite da una matrice organica formata da

proteine, mucopolisaccaridi e cristalli di carbonato di calcio, generalmente sotto forma di calcite (cristalli esagonali) o aragonite (cristalli rombici). Il legamento, a forma di fuso o di sezione di cilindro, è fissato ai bordi dorsali delle valve e grazie alla sua elasticità e alla sua posizione intercalare determina l'apertura delle valve (Goslin, 1985). È costituito soprattutto da conchiolina, sostanza analoga alla chitina e presenta uno strato esterno e uno interno, che per la loro elasticità tendono a provocare l'apertura della conchiglia. La cerniera, o articolazione delle valve, è un dispositivo a ingranaggio più o meno complicato nel quale i denti di una delle valve penetrano in un incavo dell'altra. In alcuni bivalvi, a esempio i mitili, la cerniera è assai ridotta e le valve sono unite quasi esclusivamente dal legamento, che ha l'aspetto di una banda brunastra che corre lungo la cerniera. I muscoli adduttori, inseriti perpendicolarmente rispetto alle valve, si oppongono all'azione meccanica del legamento e chiudono la conchiglia. Nel loro punto d'inserzione sulla faccia interna delle valve essi determinano le cosiddette "inserzioni".

Il mantello è generalmente attraversato da due sottili muscoli adduttori anteriori e da uno grosso posteriore, inseriti nella parte interna delle valve. La bocca, subterminale, è una fenditura trasversale le cui labbra si prolungano su entrambi i lati dell'orifizio in due paia di tentacoli labiali, lamine appiattite a forma di foglia di alloro. Sulla linea medioventrale, la massa viscerale forma una sacca più o meno resistente, dietro la quale sporge il piede, di varia forma a seconda delle specie di molluschi considerate. Nel *Mytilus galloprovincialis*, sulla linea medioventrale del piede si apre la ghiandola bissogena, la quale produce dei filamenti o bisso che si fissano a un supporto mediante la propria estremità allargata a forma di lente. Questi filamenti sono costituiti a base di aminoacidi e la loro abbondanza e resistenza dipende dallo stato fisiologico del mollusco. Nella maggior parte dei bivalvi, la ghiandola bissogena è attiva soltanto negli stadi giovanili della specie. In altre (Mitilidi), invece, la capacità di secernere bisso si conserva per l'intera durata di vita del mollusco, il che indica una preferenza per habitat con forti correnti che, a loro volta, lo rendono idoneo a una elevata capacità di filtrazione e consumo di ossigeno.

### **1.6.2 REGOLAZIONE OSMOTICA ED ESCREZIONE**

La concentrazione ionica del sangue dei bivalvi si adatta a quella dell'esterno (salinità dell'acqua di mare), per cui le variazioni della salinità esterna fanno variare il volume del corpo del bivalve; tale interscambio osmotico si realizza attraverso le branchie. I bivalvi presentano due reni (nefridi) a entrambi i lati del cuore, nei quali avviene una filtrazione del sangue il cui filtrato finisce nella cavità del mantello e da lì all'esterno. Espellono principalmente ammoniaca, e anche ossido di trimetilamina e urea. L'escrezione si realizza attraverso le branchie e il rene.

### **1.6.3 APPARATO DIGERENTE**

L'apparato digerente dei molluschi bivalvi consta di un esofago, breve tubo che sbocca in un ampio stomaco, a pareti pieghettate, crivellato di fori che sono gli orifizi dei diverticoli digerenti. I tubuli digerenti sono composti da cellule cigliate (come lo stomaco e l'esofago) e da cellule vacuolari ricche di pigmenti carotenoidi, glicoproteine e lipidi. Lo stomaco si presenta come un lungo diverticolo cieco (il cieco dello stilo) contenente lo stilo del cristallino, sottile fusto trasparente che va a poggiarsi su uno scudo gastrico. Detto stilo è traslucido o giallognolo e ha una dimensione notevole rispetto a quella del mollusco, mosso da ciglia vibratili, gira su se stesso (da 10 a 80 volte al minuto), liberando enzimi digestivi. L'intestino è relativamente lungo, più o meno ripiegato su se stesso, e suo percorso attraversa il ventricolo cardiaco prolungandosi fino al retto per sboccare nell'ano.

### **1.6.4 ALIMENTAZIONE E DIGESTIONE**

L'alimentazione dei molluschi bivalvi è microfaga, ossia a base di fitoplancton (microalghe) nonché di particelle organiche mantenute in sospensione nell'acqua (sospensivori). In condizioni normali, un mitilo di media dimensione, filtra all'incirca da 4 a 5 litri d'acqua all'ora, ed è in grado di trattenere il 90% delle particelle contenute in essa, sempre che rientrino nella gamma delle dimensioni filtrabili. Sono le ciglia laterali delle branchie che con il loro battito creano la

corrente alimentare inalante. Il ritmo del battito in un mitilo è di 2-5 pulsazioni al secondo, che possono arrivare fino a 20 pulsazioni in acque calde e povere di O<sub>2</sub>. Questa corrente formata dalle ciglia laterali assicura la respirazione dell'individuo. Con le valve leggermente socchiuse, si produce una lieve corrente inalante che fornisce nuova acqua alla zona ventrale della cavità palleale. Questa corrente penetra nell'emibranchia passando tra i filamenti adiacenti; le ciglia latero-frontali, le cui estremità vanno praticamente a toccare le corrispondenti estremità del filamento adiacente, fanno da setaccio trattenendo le particelle trasportate. È noto che il mitilo è in grado di captare in modo assai efficiente le particelle con diametro compreso tra i 2 e i 5 micron. Questa gamma di misure comprende un gran numero di batteri liberi (le cui dimensioni medie sono comprese tra 0,5-1 micron e 1-5 micron), particelle di argilla, organismi planctonici, larve e uova di un gran numero di specie, resti di organismi vegetali e animali. Le particelle alimentari agglutinate all'interno di un cordone mucoso, penetrano nella bocca e vengono convogliate attraverso un breve esofago cigliato che sbocca nello stomaco. Questo organo è circondato da una grande massa ghiandolare a funzioni digerenti: la ghiandola digerente o epatopancreas.

### **1.6.5 APPARATO RESPIRATORIO**

La respirazione viene effettuata attraverso le branchie, che sono responsabili dell'interscambio gassoso, oltre a essere il luogo in cui si realizza la captazione delle particelle alimentari che penetrano nella cavità palleale, specialmente nei lamellibranchi. Esse sono situate a sinistra e a destra del corpo e tra la massa viscerale e il mantello. Normalmente ve ne sono due su ciascun lato.

### **1.6.6 APPARATO RIPRODUTTORE**

I sessi nei mitili sono separati (unisessuali). La fecondazione si realizza a caso, e avviene in mare. Le femmine producono nelle ovaie una sostanza che, spargendosi nell'acqua di mare, provoca l'eiaculazione nei maschi vicini e, a sua volta, lo sperma eiaculato nell'acqua scatena nelle femmine la deposizione delle uova.

### 1.6.7 APPARATO CIRCOLATORIO

L'apparato circolatorio è costituito da un cuore dorsale racchiuso in un pericardio che comprende un ventricolo e due atri laterali. La circolazione dei bivalvi è aperta, ossia il sangue travasa e inonda i tessuti formando un sistema lagunare in parte del suo percorso. I molluschi sono animali a sangue freddo e quindi la loro temperatura corporea si adatta a quella dell'ambiente. Pertanto, se la temperatura ambientale (in questo caso quella dell'acqua marina) aumenta rapidamente, possono essere colpiti da embolia gassosa (la malattia delle bolle), poiché l'aumento di temperatura fa diminuire la solubilità dei gas nel sangue e di conseguenza si creano delle bolle d'aria nel corso sanguigno. Il loro sangue è altresì incoagulabile. Alcuni bivalvi sono privi dei pigmenti respiratori per cui l'ossigeno si dissolve direttamente nel plasma. In altri, il pigmento respiratorio contenuto nel plasma sanguigno è l'emocianina, nella quale il rame svolge lo stesso ruolo del ferro per l'emoglobina (Mengoli, 1998).



**Figura.1.5** Esempio di *Mytilus galloprovincialis*

## 1.7 I BIOMARKER

L'ambiente acquatico è il ricettacolo finale dei contaminanti ambientali, sia scaricati direttamente, che provenienti da processi ideologici e atmosferici. La presenza di xenobiotici nell'acqua di per sè non significa che vi possano essere effetti dannosi per gli organismi viventi, tuttavia occorre stabilire la connessione tra i livelli di esposizione ambientale, la contaminazione effettiva degli organismi, e gli effetti avversi possibilmente prima che si verifichino effetti avversi a lungo termine in genere irreversibili.

L'Analisi di Rischio Ecologico, o Ambientale, nota con l'acronimo ERA è definita come la procedura attraverso la quale vengono stimati attraverso metodologie scientifiche gli effetti avversi, presenti o probabili, di inquinanti o altre attività dell'uomo sull'ecosistema (Depledge and Fossi, 1994). Nel contesto dell'ERA una corretta analisi delle interazioni complesse tra le contaminazioni antropiche e l'ambiente richiede l'applicazione di un approccio multidisciplinare e la determinazione di diversi parametri, in grado di descrivere e convertire i livelli effettivi di esposizione dei contaminati e gli effetti avversi sull'ambiente nelle situazioni di pericolo. L'ERA fornisce una base quantitativa per paragonare o dare una priorità dei rischi valutando endpoint ben misurabili. Il processo ERA può essere suddiviso in una fase scientificamente orientata di "analisi" ed in una fase politicamente orientata di "gestione". L'analisi comprende la identificazione del pericolo, la valutazione dell'esposizione e dell'effetto e la caratterizzazione del rischio, mentre la gestione riguarda i regolamenti definiti sulla base della fase precedente. Le due fasi sono distinte ma molto legate fra loro dato che stabilito un rischio nella fase di analisi, la gestione esamina le soluzioni al problema.

La fase di analisi, basata sul TRIAD (processo di valutazione della qualità dell'ambiente attraverso 3 tipologie o "linee" di analisi, Chimica, Ecologica e Tossicologica; Fig. 1.6) è stata via via ritenuta incompleta principalmente perché gli effetti deleteri su una popolazione sono spesso difficili da

identificare poiché si manifestano nel lungo periodo, e nel frattempo gli effetti possono essere andati oltre la possibilità di porvi rimedio (Fig. 1.7).

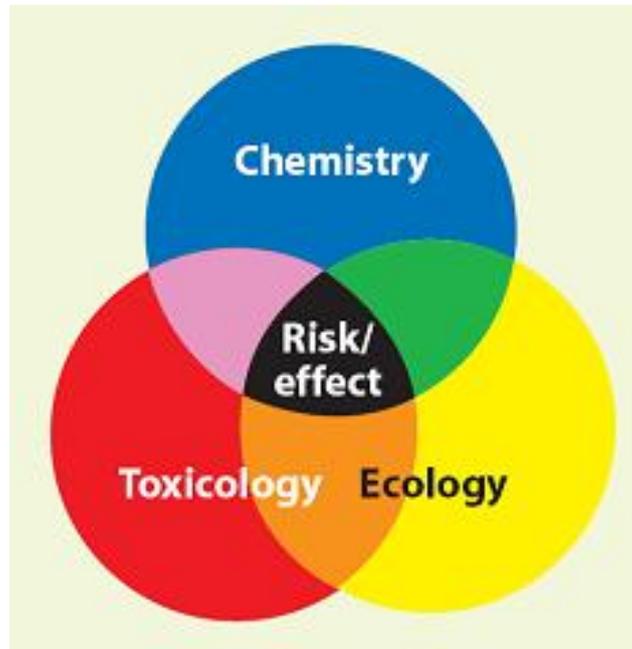


Figura 1.6 Le componenti del TRIAD

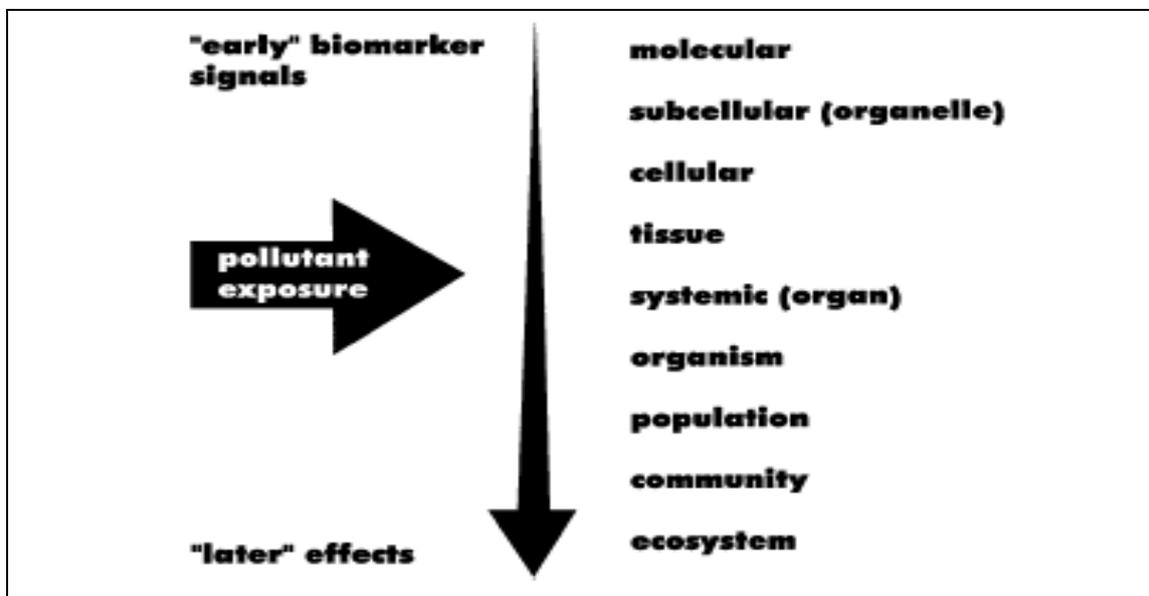


Figura1.7 Rappresentazione schematica della sequenza temporale con cui un inquinante induce risposte in un sistema biologico (da Van Der Oost et al., 2003).

Questo scenario ha suggerito la ricerca di segnali precoci, i biomarker, che informano dell'effetto avverso di inquinanti ambientali in tempi molto rapidi. E' compreso già da molto tempo che effetti

ai più alti livelli gerarchici dell'organizzazione biologica sono sempre preceduti da cambiamenti precoci di processi biologici, e pertanto possono essere usati per prevederli (Bayne et al., 1985). Un biomarker è definito come quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo (individui o popolazione) la quale fornisce l'evidenza di una esposizione e/o un effetto ad uno o più composti inquinanti (Depledge, 1994). In un contesto ambientale, i biomarker sono indicatori molto sensibili che dimostrano l'ingresso della sostanza tossica nell'organismo, la sua distribuzione ed il suo effetto tossico su bersagli spesso specifici e critici per la vita dell'organismo stesso (McCarthy and Shugart, 1991).

I biomarker vengono classificati come:

- Biomarker di esposizione: esprime la risposta di un organismo ad una contaminazione che si attua attraverso processi di inibizione enzimatica, interazione tra recettori, alterazioni dell'omeostasi.
- Biomarker di effetto: misure a livello biochimico, fisiologico all'interno dei tessuti o fluidi corporei di un organismo che possono essere associati a possibili danni all'organismo. Si valutano fattori quali la mortalità, la riproduzione, la diminuzione nella crescita ecc...
- Biomarker di suscettibilità: indica la capacità intrinseca o acquisita di un organismo di rispondere ai cambiamenti in seguito ad esposizione a specifiche sostanze, includendo fattori genetici e cambiamento dei recettori che alterano la suscettibilità di un organismo all'esposizione.

Alcuni esempi di biomarker sono:

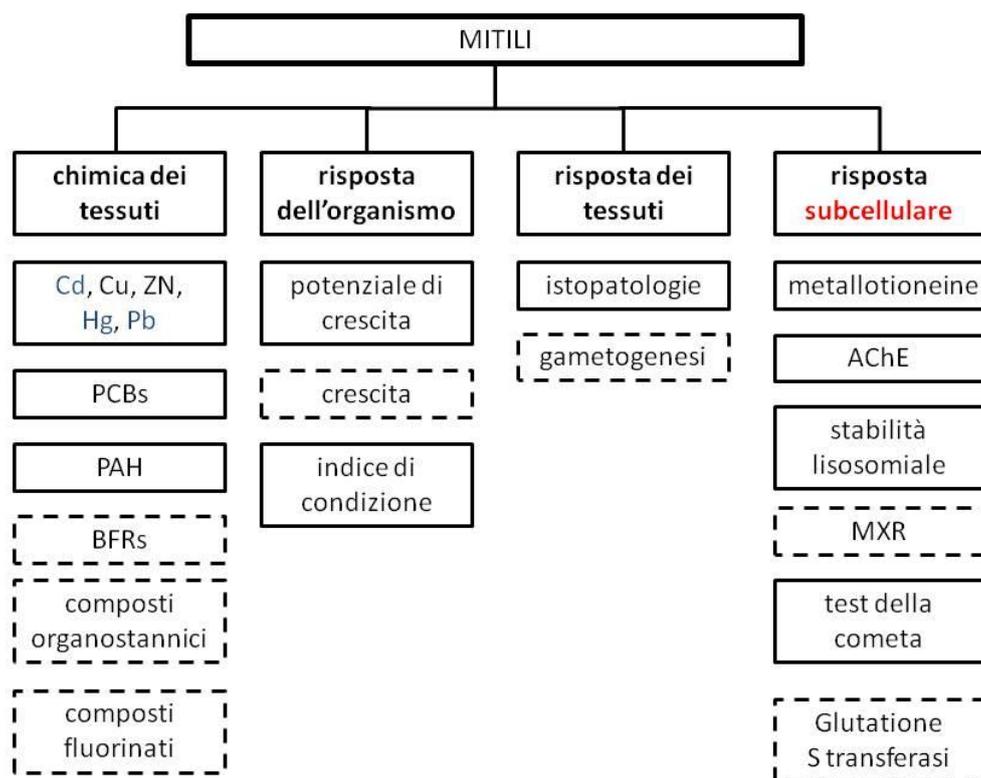
- Stabilità delle membrane lisosomiali (Lysosome Membrane Stability, LMS) valutata con il: Neutral red retention assay; indica alterazione delle membrane dei lisosomi e quindi tossicità cellulare.
- Rapporto lisosomi/citoplasma, l'ingrandimento dei lisosomi indica tossicità cellulare
- Attività del Glutathione S-transferasi (GST), enzima coinvolto nella fase II della detossificazione indica attivazione dei processi di detossificazione

- Attività della Catalasi (CAT), un enzima antiossidante coinvolto nella detossificazione, indica uno stress ossidativi in atto
- Attività della Superossido Dismutasi (SOD), enzima antiossidante, indica stress ossidativo
- Attività della Acetilcolinesterasi (AChE), indicatore di neurotossicità
- Lipofuscine: accumulo di prodotti della perossidazione lipidica per alterato metabolismo e stress ossidativi
- Lipidi neutri: accumulo di Lipidi neutri, per alterato metabolismo cellulare
- concentrazione di Malondialdeide (MDA), un composto intermedio della perossidazione lipidica
- Metallotioneine: indicano esposizione a metalli.
- Danno al DNA: indica presenza di agenti genotossici
- Vitellogenina: il suo aumento nei maschi indica l'esposizione a xenoestrogeni.

L'utilizzo di biomarker a livello cellulare e molecolare è uno strumento particolarmente sensibile e precoce. Per questo motivo, l'applicazione di biomarker come "early warning" può essere utilizzata in un'ottica di prevenzione da attuare prima che si verifichino danni ambientali irreversibili con gravi conseguenze ecologiche. Non a caso i biomarkers sono definiti indicatori che forniscono, nel breve termine, risposte che rappresentano potenziali effetti biologici a lungo termine (McCarthy and Shugart, 1991).

I processi di valutazione della qualità dell'ambiente o di biomonitoraggio (inteso come il regolare e sistematico uso di organismi viventi per valutare alterazioni della qualità dell'ambiente) in molti Paesi nord-europei o nord-americani fanno ampio uso di biomarker insieme a valutazioni come il bioaccumulo e la biomagnificazione. Negli anni novanta, l'approccio con utilizzo di biomarker ha avuto un'ampia diffusione nei programmi di monitoraggio ambientale sia in Europa che negli Stati Uniti, alcuni esempi pratici sono relativi ai monitoraggi realizzati nei mari del Nord commissionati dal Consiglio internazionale per l'esplorazione dei "sea ices" e dalla Commissione oceanografica intergovernamentale, I.O.C. (Stebbing and Dethlefsen, 1992) o al programma ambientale delle

Nazioni Unite nel Mar Mediterraneo che include una varietà di biomarker (UNEP, 1997). Nell'ambito della Marine Strategy Framework Directive (2008/56/EC) (MSFD) la Commissione Europea ha stabilito i criteri e le metodologie standard per assicurare un approccio coerente di valutazione del Good Environmental Status (GES) ovvero la buona qualità dell'ambiente, con il supporto scientifico di ICES e JRC e sulla base di precedenti evidenze (OSPAR, RAMP, e MEDPOL). Il Descrittore 8 della Direttiva riguarda la necessità di assicurare che “Concentrations of contaminants are at levels not giving rise to pollution effects”. A questo proposito viene raccomandato che il raggiungimento del GES sia basato su programmi di monitoraggio che determinino le concentrazioni degli inquinanti e che nel contempo conducano analisi biologiche inerenti gli effetti degli inquinanti sugli organismi marini (JRC, 2010). In particolare viene richiesto l'uso di una combinazione di metodologie convenzionali e altre più innovative per ottenere un approccio più potente ai fini della GES. L'analisi o il monitoraggio ambientale relativo al Descrittore 8 si deve dotare quindi di indici di allarme precoce, quali sono i biomarker, analizzati sia nei pesci che nei mitili (Fig. 1.8)



**Figura 1.8 Schema dei metodi da includere in un programma integrato di analisi che utilizzi i mitili come organismi sentinella ai fini della Marine Strategy (JRC, 2010 modificato)**

Pochi laboratori in Italia hanno al momento le conoscenze necessarie all'analisi della batteria di biomarker suggerita nello schema precedente (Fig. 1.8), eventualmente anche ampliata sulla base dei più recenti studi. Tra questi, figura il laboratorio di Fisiologia e Biochimica ambientale del CIRSA dell'Università di Bologna a Ravenna presso il quale è stato realizzato il lavoro documentato dal seguente elaborato di tesi di laurea. In questo studio in particolare i biomarker sono stati utilizzati non per un biomonitoraggio ma per identificare eventuali alterazioni provocate nei mitili dalla esposizione in acquario ad un farmaco ad uso umano ampiamente rilevato nell'ambiente acquatico (si veda lo Scopo della Ricerca).

## 1.8 SISTEMA ESPERTO

Sebbene i biomarker siano un ottimo strumento per valutare le risposte biologiche ai cambiamenti ambientali e all'esposizione ad inquinanti, sia in condizioni di laboratorio che sul campo, si sono riscontrate alcune difficoltà nel mettere in relazione quantitativamente e oggettivamente le risposte dei differenti biomarker per una loro integrazione al fine di stabilire lo stato di salute degli organismi sentinella e quindi dell'ambiente. Un metodo efficace in grado di integrare i dati dei biomarker è l'applicazione di un sistema esperto che, attraverso i risultati dell'analisi di una batteria di biomarker, traduce i dati biologici in una valutazione realistica e obiettiva dei cambiamenti nella fisiologia dell'organismo indotti dall'esposizione a sostanze inquinanti. Sviluppato alcuni anni orsono (Dagnino et al., 2008) permette un'interpretazione oggettiva della risposta biologica prendendo in considerazione il significato biologico dei diversi biomarker e le possibili interferenze che possono verificarsi tra diversi parametri. Come facilmente intuibile, alla base dello sviluppo del sistema esperto c'è la relativamente approfondita conoscenza della fisiologia dei mitili e delle loro risposte agli inquinanti ambientali, sviluppate in decenni di ricerche e applicazione (Viarengo et al., 2007).



Cap.2

# SCOPO DELLA TESI



La presenza di residui dei farmaci ad uso umano o veterinario è ampiamente documentata nei fiumi, nei laghi, e nelle acque marine costiere a concentrazioni che vanno dai  $\mu\text{g}$  ai  $\text{ng/L}$ ; concentrazioni inferiori ma significative sono state identificate anche in acque potabili in molti Paesi del mondo (Santos et al., 2010). Per molti anni si è ritenuto che a tali modeste concentrazioni i residui dei farmaci non rappresentassero un rischio per la salute dell'ecosistema e dell'uomo. Questa conclusione era peraltro suffragata dagli esiti dei test ecotossicologici (Fent et al., 2006). Tuttavia, negli anni più recenti si è preso atto che i farmaci sono sostanze disegnate per essere biologicamente attive, avere un effetto terapeutico a basse dosi ed eventualmente indurre effetti collaterali non specifici a dosi maggiori o assunzioni prolungate. Infatti, si stanno accumulando chiare evidenze del fatto che a concentrazioni anche inferiori ai  $\text{ng/L}$  i residui di alcuni farmaci hanno effetti significativi sugli organismi acquatici, inerenti sia lo stato di salute in generale ma anche funzioni endocrine, nervose e riproduttive (Franzellitti *et al.*, 2011).

I residui dei farmaci sono per questo considerati contaminanti emergenti, ossia potenziali inquinanti per i quali non esistono ancora regolamenti o linee guida che limitino la loro concentrazione ambientale. Da un lato non è possibile agire come nel caso dei comuni inquinanti, impedendone l'utilizzo; dall'altro però sono necessari studi scientifici per valutare quali sono i farmaci che hanno effetti significativi sulla fauna acquatica mirando ad una loro sostituzione con molecole meno persistenti oppure ad altre forme di mitigazione. I farmaci su cui orientare gli studi in questa fase sono quelli maggiormente persistenti, quelli presenti a maggiore concentrazione in ambiente perché molto utilizzati o poco trattenuti dai depuratori, o quelli per i quali ci siano conoscenze che fanno sospettare attività biologiche su organismi non bersaglio (Christen et al., 2011).

Fra questi farmaci abbiamo scelto la fluoxetina, antidepressivo di prima generazione ma ancora oggi ampiamente utilizzato e noto come principio attivo del Prozac. Il lavoro di Tesi ha voluto studiare i potenziali effetti della fluoxetina sui mitili, *Mytilus galloprovincialis*, esposti per una settimana a concentrazioni del farmaco pari a 0,03-0,3-3-30-300  $\text{ng/L}$ . Le concentrazioni inferiori sono nell'intervallo ambientale; le maggiori sono presenti nelle acque reflue dai depuratori (Fent et al., 2006). I mitili sono organismi sentinella molto usati negli studi di valutazione della qualità ambientale, e se ne conoscono ormai bene le risposte a molti contaminanti ambientali. I mitili sono stato utilizzati come organismi sentinella e dopo esposizione al farmaco è stata esaminata una batteria di 8 biomarker, ovvero di risposte biochimiche e funzionali note per essere alterate dai contaminanti ambientali (Viarengo et al., 2007), per ottenere varie informazioni:

- La diminuzione della stabilità delle membrane lisosomiali, indica una riduzione dello stato di salute generale degli organismi;

- L'alterazione dell'attività degli enzimi catalasi e glutatione S trasferasi indica stress ossidativo o induzione di meccanismi di detossificazione;
- La diminuzione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi indica neurotossicità
- L'accumulo di lipofuscine o lipidi neutri indica stress ossidativo o alterazioni del metabolismo
- L'aumento del rapporto lisosomi/citoplasma indica eccessiva attivazione dei lisosomi e quindi tossicità cellulare
- La variazione di Malondialdeide (MDA) composto intermedio della perossidazione lipidica indica un stress ossidativo in corso

Una volta conclusi gli esperimenti i risultati ottenuti sono stati integrati utilizzando un Sistema Esperto (Dagnino et al., 2007), da cui si è ricavata una valutazione oggettiva dello stress indotto negli organismi dalla pur breve esposizione alla fluoxetina.



Cap. 3  
MATERIALI  
E METODI



### 3.1. ESPOSIZIONE ORGANISMI ALLA FLUOXETINA

L'esposizione dei mitili ha avuto una durata di sette giorni, durante i quali gli organismi sono stati esposti a cinque diverse concentrazioni di fluoxetina:

300ng/L;

30ng/L;

3ng/L;

0,3ng/L;

0,03ng/L.

Per ogni trattamento sono state effettuate tre repliche utilizzando vasche contenenti ognuna 10 L d'acqua di mare e 20 organismi; inoltre sono state allestite quattro vasche di controllo contenenti le stesse quantità di acqua e di mitili ai quali non è stato somministrato il farmaco (fig.3.1). Per tutta la durata dell'esposizione, è stato somministrato ogni giorno il cibo e la fluoxetina, mentre ogni 48h è stato effettuato il cambio d'acqua.



**Figura 3.1: esposizione dei mitili in vasche**

Al termine dei sette giorni è stato realizzato il campionamento dei tessuti: sono stati prelevati i mantelli, le branchie e le ghiandole digestive congelati in azoto liquido e successivamente conservati ad una temperatura di  $-80^{\circ}\text{C}$ . E' stata prelevata l'emolinfa dai mitili per il Neutral Red

Retention Assay ed infine, per ogni vasca, sono state utilizzate quattro ghiandole, posizionate sui chucks (supporti metallici per le analisi al criostato) e congelate con N-esano raffreddato in azoto liquido e immediatamente trasferite a  $-80^{\circ}\text{C}$ , le quali, come vedremo in seguito, saranno utilizzate per le analisi dei biomarkers al criostato.

### 3.2 NEUTRAL RED RETENTION ASSAY

Il metodo è basato sul principio che il colorante (neutral red) somministrato agli emociti vitali viene immagazzinato all'interno dei lisosomi e trattenuto per un certo periodo di tempo: fino a 180 minuti quando le cellule sono in buono stato di salute. Se le membrane lisosomiali sono destabilizzate, in seguito all'esposizione degli animali a fattori di stress, il neutral red viene trattenuto per intervalli di tempo minori e perso all'interno del citosol (Lowe and Pipe, 1994). La valutazione dei tempi di ritenzione all'interno dei compartimenti lisosomiali viene effettuata prelevando emociti dal muscolo adduttore dei mitili. Successivamente, si passa alla preparazione dei vetrini sui quali si distribuiscono  $5\ \mu\text{L}$  di poli-L-lisina, per far aderire gli emociti, e si aggiungono  $40\ \mu\text{L}$  di emolinfa ponendoli al centro del vetrino; il tutto si lascia al buio per 30 minuti in una camera umida in modo da far aderire gli emociti sulla superficie del vetrino. Infine, si aggiungono  $40\ \mu\text{L}$  di neutral red e si lascia in incubazione per 15 minuti. I vetrini vengono osservati al microscopio ottico (Zeiss, Axioscop 40) ogni 15 minuti fino a quando più del 50% delle cellule mostra una perdita di colorante dovuto alla destabilizzazione delle membrane lisosomiali o anomalie come un ingrandimento cellulare (Moore *et al.* 2008). Questo dato viene registrato e permetterà il calcolo della % di lisosomi destabilizzati nei controlli e negli animali esposti.

### **3.3 RAPPORTO LISOSOMI/CITOPLASMA**

Partendo dai chunks preparati in fase di campionamento, sui quali erano state poste 4 ghiandole, utilizzando un criostato (Microm, HM505 N) si realizzano delle sezioni (fettine) di campione da 10 µm di spessore. Le fettine, una volta disposte sui vetrini, sono state immerse in una Hellendal contenente una soluzione di Polypep e Naftolo per 20 minuti e sottoposte a colorazione con una soluzione di Fast violet al buio per 10 minuti. Terminata la colorazione, si applica un copri vetrino e si lasciano asciugare i vetrini. In seguito, si procede all'analisi delle sezioni di ghiandola con microscopio ottico effettuando delle fotografie (5 per ghiandola) da utilizzare per l'analisi d'immagine. Quest'ultima, realizzata mediante software "ScionImage 4.0" permette di stabilire il rapporto tra le regioni colorate corrispondenti al volume dei lisosomi (la colorazione assunta dai lisosomi è dovuta all'attività dell'enzima N-Acetyl-b-esosaminidasi) e l'intero volume rappresentato nell'immagine, ovvero il citoplasma cellulare più i lisosomi. In questo modo è possibile confrontare le ghiandole digestive prelevate dai mitili di controllo e da quelli trattati.

### **3.4 ACCUMULO DI LIPOFUSCINE**

Il seguente metodo di analisi, come quello precedentemente descritto, prevede la realizzazione di sezioni di ghiandola digestiva (anche in questo caso si utilizza il criostato Microm, HM505 N) da 10 µm di spessore. Le fettine, disposte sui vetrini, sono state fissate con una soluzione di Ca-Formolo per 15 minuti. Per la colorazione delle lipofuscine all'interno dei lisosomi è stato utilizzato il reattivo di Schmorl (Pearse, 1972). Ovvero, sono state immerse in una soluzione 3:1 di Cloruro di Ferro  $\text{FeCl}_3$  1% e Potassio Ferrocianuro  $\text{Fe}(\text{KCN})_6$  1% a temperatura ambiente per 5 minuti, al buio. In seguito, è stata eliminata la soluzione, ed è stato aggiunto acido acetico  $\text{CH}_3\text{COOH}$  1% per 1 minuto; una volta asciugati i vetrini, si è proceduti all'analisi al microscopio ottico. Analogamente a quanto detto per il metodo precedente, sono state effettuate delle fotografie da sottoporre ad analisi

d'immagine (con software "ScionImage 4.0") attraverso la quale, è stato possibile determinare la superficie di ghiandola colorata, proporzionale alla quantità di lipofuscine presenti.

### **3.5 ACCUMULO DI LIPIDI NEUTRI**

Anche in questo caso, i chunks vengono posizionati all'interno del criostato (Microm, HM505 N) ottenendo fettine di 10 µm di spessore. Il tutto è stato fissato in una soluzione di Ca-formolo per 15 minuti a 4°C, successivamente i vetrini sono stati posti in Trietilfosfato 60% per 3 minuti a temperatura ambiente ed le sezioni colorate con una soluzione di Oil Red all'1% per 15 minuti al buio a temperatura ambiente. La colorazione selettiva ad opera del colorante Oil Red risulta fondamentale per la valutazione dell'accumulo dei lipidi neutri (Donnini *et al.* 2007). Infine, è stato fissato il colorante in Trietilfosfato 60% per 30 secondi a temperatura ambiente. Come per i due casi precedenti, sono state effettuate delle fotografie da sottoporre ad analisi d'immagine (con software "ScionImage 4.0") attraverso la quale, è stato possibile determinare la superficie di ghiandola colorata, proporzionale alla quantità di lipidi neutri presenti.

### **3.6 DETERMINAZIONE DELLA MALONDIALDEIDE (MDA)**

La malondialdeide, prodotto intermedio del processo di perossidazione dei lipidi, è stata determinata seguendo il protocollo di Banni *et al.* (2007). Si parte dalle ghiandole dei mitili alle quali sono stati aggiunti 2 volumi di tampone Tris-HCl (20mM) contenente 0,1% di β-mercaptoetanololo. Il tutto è stato omogenato tramite un potter, e centrifugato a 8.000 xg a 4 ° C per 20 minuti. Il sovrinatante è stato in parte prelevato e conservato in NaOH per il dosaggio delle proteine, e in parte congelato a -80°C. In fase di analisi, sono stati scongelati i campioni ai quali è stato aggiunto NMPI (N-methyl-2-phenylindole) sciolto in acetonitrile e metanolo (reattivo R1) e HCl 37% 10,1 N (reattivo R2) e sono stati posti a bagnomaria per 40 minuti a 45°C in lenta

agitazione. Successivamente sono stati centrifugati a 15.000 x g per 10 minuti a temperatura ambiente. Il sovrnatante è stato prelevato e caricato nella micropiastra che inserita in un lettore di micropiastre (Biotek EL 808) ha fornito l'assorbanza letta a 570 nm. La concentrazione di MDA nei campioni viene valutata usando una curva di calibrazione di standard di TMOP (1,1,3,3,tetrametossipropano). Il risultato finale è stato espresso in nmol/mg proteine (Martin-Diaz *et al.*, 2009).

### **3.7 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER L'ANALISI DI CATALASI (CAT), GLUTATIONE S-TRANSFERASI (GST) e ACETILCOLINESTERASI (AChE)**

I campioni da sottoporre alle analisi delle attività enzimatiche necessitano di una preparazione che prevede l'omogeneizzazione. Per le analisi di CAT e GST è stato seguito il protocollo di Mimeault *et al.* (2006) che consiste nell'omogeneizzare le ghiandole e le branchie dei mitili (nel nostro caso ne sono stati utilizzati 2 per vasca, ossia 6 per trattamento) aggiungendo 5 volumi di tampone di omogeneizzazione KPb (Potassium Phosphate Buffer) 50 mM e 1 µL di cocktail di inibitori delle proteasi ogni 100 mg totali di tessuto. L'omogenato è stato prodotto con un potter e centrifugato a 13.000 rpm a 4°C per 15 minuti. Il sovrnatante è stato in parte prelevato e diluito in NaOH per la determinazione delle proteine presenti nel tessuto ed in parte congelato in eppendorf a -80° C per la determinazione delle attività degli enzimi.

Per analizzare l'attività dell'AChE è stato seguito un procedimento di preparazione dei campioni differente da quello precedentemente descritto: l'omogeneizzazione delle ghiandole e delle branchie si è ottenuto impiegando 4 volumi di tampone PBS (Phosphate Buffered Saline) 10 mM. L'omogenato è stato centrifugato a 8.000 x g a 4°C per 30 minuti. È stato prelevato il sovrnatante poi aliquotato e congelato a -80°C per il dosaggio di proteine e per la determinazione dell'attività enzimatica.

### **3.8 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA CATALASI**

L'attività enzimatica della CAT nelle ghiandole digestive e nelle branchie viene ricavata dai valori di assorbanza letti attraverso uno spettrofotometro (Beckman Coulter, DU 800 Spectrophotometer). Sono stati inseriti nella cuvetta di quarzo da 3 ml: 20  $\mu$ L di campione e 2,98 ml di una soluzione di  $H_2O_2$  (55 mM) e tampone di omogeneizzazione KPB (50 mM) precedentemente preparata. L'attività dell'enzima è inversamente proporzionale al consumo del perossido d'idrogeno (la CAT catalizza la reazione di conversione di  $H_2O_2$  in  $H_2O$  e  $O_2$ ) per cui possiamo stimarla valutando la diminuzione dell'assorbanza a 240 nm. È stata valutata l'attività relativa ad una reazione della durata di 120 secondi.

### **3.9 DETERMINAZIONE ATTIVITÀ DELLA GLUTATIONE S-TRANSFERASI**

L'attività enzimatica della GST è stata misurata utilizzando un lettore di micro piastre (Biotek EL 808) alla lunghezza d'onda di 340 nm. All'omogenato contenente l'enzima viene aggiunto un substrato formato da 1-Cl-2,4-dinitrobenzene CDNB (0,8 M) e glutatione ridotto. L'incremento dell'assorbanza registrato a 340 nm per 8 minuti è dovuto alla reazione di coniugazione del CDNB con il glutatione ridotto (GSH) esercitata dall'enzima stesso in maniera proporzionale alla sua attività nei tessuti (Martin-Diaz *et al.*, 2009).

### **3.10 DETERMINAZIONE ATTIVITÀ DELL' ACETILCOLINESTERASI**

L'attività enzimatica dall'AChE nelle ghiandole digestive e nelle branchie dei mitili è stata misurata secondo il principio che l'enzima idrolizza il substrato acetiltiocolina producendo tiocolina che riduce uno specifico reattivo che aumenta la densità ottica della soluzione. Per la lettura dell'assorbanza a 405 nm è stato utilizzato il lettore di micro piastre (Biotek EL 808). La lettura è stata effettuata dopo 10 minuti dall'attivazione dell'enzima con il substrato. È stato seguito il metodo di Ellman (Ellman *et al.*, 1961) ottimizzato per i bivalvi, applicato ai campioni di ghiandole

e branchie precedentemente preparati (paragrafo 3.7). Nel saggio è stata utilizzata una quantità di campione tale che nel volume finale fossero presenti 0,5 mg/mL di proteine precedentemente determinate con il metodo di Lowry et al. (1951). Ad ogni campione sono stati addizionati 50 µL di DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), o reagente di Ellman), è stato poi aggiunto il tampone PBS (Phosphate Buffered Saline) e l'acetiltiocolina (l'enzima acetilcolinesterasi idrolizza l'acetiltiocolina producendo tiocolina e acetato, la tiocolina riduce il reattivo DTNB che libera nitrobenzoato). Trascorsi i 10 minuti è stata effettuata una lettura che è stata confrontata con un bianco che non contiene il substrato, e con una curva di standard di AChE.

### **3.11 DOSAGGIO PROTEINE**

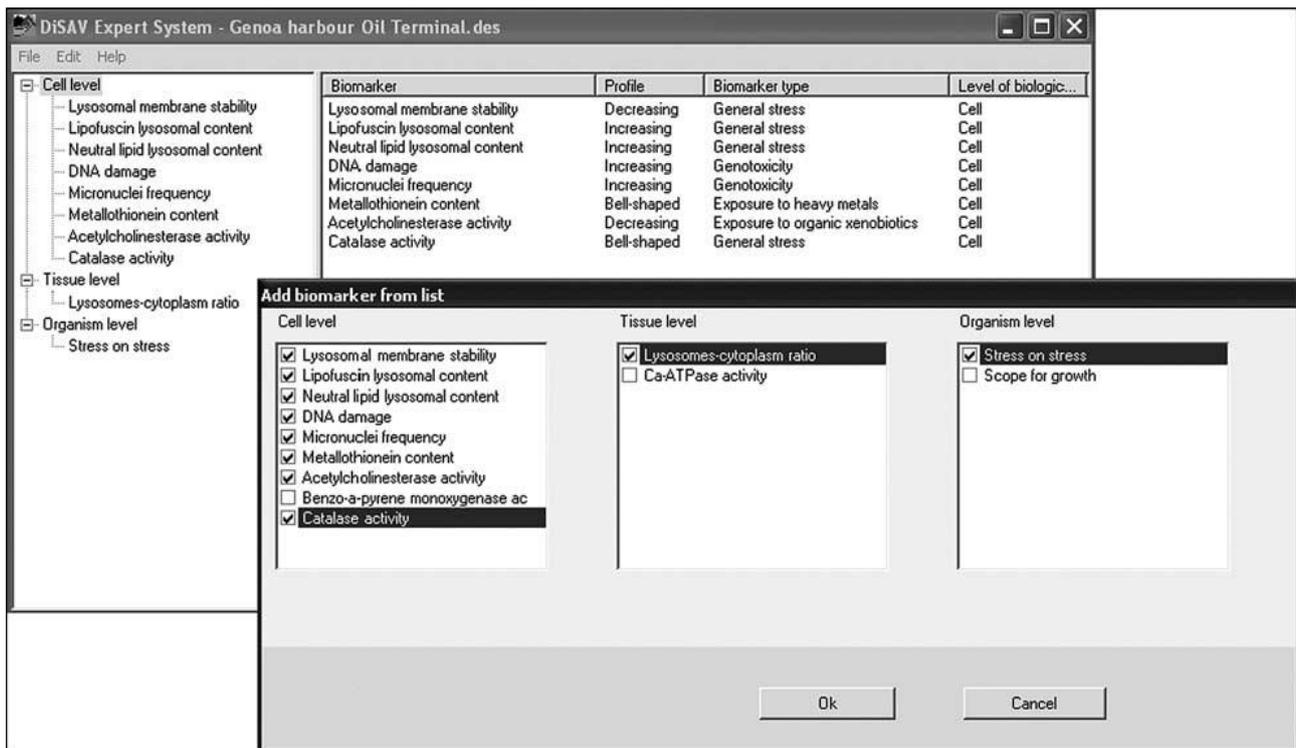
Sono state valutate le concentrazioni delle proteine totali presenti nei campioni alle quali sono state rapportati i risultati ottenuti dai saggi enzimatici (CAT, GST, AChE) e dalla valutazione della MDA. È stato ripetuto un dosaggio di proteine per ognuna delle analisi mediante il protocollo di Lowry *et al.*, 1951 che prevede la determinazione della quantità di proteine nei campioni usando una curva di calibrazione di standard di BSA (albumina). I campioni, già diluiti 1:5 in NaOH (1 N) all'atto della preparazione (vedi paragrafo 3.6 e 3.7), sono stati ulteriormente diluiti 1:1 con acqua distillata e sono stati caricati, insieme agli standard, nei pozzetti di una micro piastra alla quale successivamente sono stati aggiunti: il reattivo A+B (Na/K tartrato 0,7 mM; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 187 mM ; NaOH 100 mM) ed il reattivo C (soluzione 1:1 del Reattivo di Folin con acqua distillata) per poi essere letti nel lettore di micropiastre (Biotek EL 808). I risultati sono espressi in µg di proteine/µL di campione.

### 3.12 SISTEMA ESPERTO

Per correlare i risultati ottenuti dai vari biomarker e ottenere il livello di stress procurato agli organismi dalla esposizione alla fluoxetina, è stato applicato un sistema esperto (Dagnino et al., 2007). Il sistema esperto contiene un database di regole provenienti dalla grande quantità di dati disponibili in letteratura sui mitili, ottenuti sia in studi di laboratorio che raccolti dal campo. Per analizzare ciascun biomarker, nel contesto delle sue caratteristiche individuali, i parametri biologici sono suddivisi in diversi gruppi, sulla base sia del loro andamento lungo un gradiente di inquinamento (caratterizzato da un profilo crescente, decrescente o 'a campana'), sia del significato biologico dei loro mutamenti (indicatori di stress generale, di esposizione) sia del livello gerarchico di organizzazione biologica (molecolare, cellulare, organismo). I parametri riscontrati in campo e con esperimenti di laboratorio vengono confrontati con quelli misurati in organismi di controllo. Le differenze sono evidenziate attraverso una analisi di tipo non parametrico (Mann-Whitney U test). Differenze significative nei valori dei biomarker tra il controllo e gli organismi esposti sono classificati in base ai limiti di soglia stabiliti sulla base del caratteristico profilo di risposta di ciascun biomarker. Queste soglie considerano le grandi differenze tra i dati, come ad esempio un incremento di 2 o 3 volte per i biomarker di esposizione/accumulazione e di genotossicità o una diminuzione compresa tra il 50% e 15% per quei biomarker caratterizzati da un profilo di risposta decrescente. Le soglie utilizzate nel sistema esperto sviluppato sono state scelte sulla base di studi precedenti nei quali era previsto l'utilizzo di mitili in esperimenti ecotossicologici e in programmi di biomonitoraggio.

Questa procedura permette di classificare ciascun risultato in una delle quattro classi possibili. Il sistema seleziona un parametro guida tra la batteria di biomarker, vale a dire il parametro più reattivo che, a meno di istruzioni differenti da parte dell'operatore, è la stabilità delle membrane lisosomiali. I cambiamenti di questo parametro sono quelli principalmente considerati nel processo di integrazione dei dati. Se i cambiamenti osservati nella stabilità della membrana lisosomiale sono

accompagnati da variazioni di un adeguato numero di altri parametri (60% del numero totale di biomarker), il sistema esperto assegna un livello di stress pari a D. Quando invece le variazioni nella stabilità delle membrane lisosomiali sono accompagnati da variazioni del valore di un numero limitato di biomarker (ad esempio il 20% del numero totale di parametri), viene assegnata la classe C. Viene classificato come E il livello di stress degli animali che mostrano alterazioni forti dei biomarker a livello dell'intero organismo. Questi cambiamenti indicano una condizione patologica che può essere riflessa a livello di popolazione. il sistema è in grado di descrivere le diverse fasi temporali di evoluzione dello stress anche con un numero ridotto di parametri biologici. E' interessante notare che non tutti i biomarker hanno lo stesso peso nella determinazione generale dello stress indotto. Infatti, i parametri crescenti e decrescenti (come la stabilità della membrana lisosomiale, lipidi neutri e lipofuscine, frequenza micronuclei, ecc ..) sono più adatti a caratterizzare l'evoluzione temporale dello stress già dalle prime fasi di insorgenza dello stato patologico. Mentre i parametri con andamento a campana sono in grado di descrivere lo sviluppo dello stress fino al mantenimento di un equilibrio delle funzioni cellulari. Ovvero, quando la cellula ha raggiunto il livello massimo di risposta allo stress e la sintesi proteica è superata dal catabolismo di queste molecole e/o gli enzimi sono inibiti, i biomarker "a campana" non sono utilizzabili per descrivere l'evoluzione finale dello stress se non vengono valutati contemporaneamente i dati di stabilità delle membrane lisosomiali. Infatti solo con questi dati il sistema è in grado di interpretare correttamente il significato reale dei valori inclusi nella curva "a campana" (cioè se il valore è nella parte ascendente o discendente della curva).



**Figura 1.9** Esempio di selezione di biomarker dalla lista presente nel software di elaborazione per sistema esperto (Dagnino et al., 2007).

### 3.13 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software statistico SigmaStat 3.1. Sono state determinate differenze significative tra i campioni trattati e i controlli applicando l'ANOVA (Analisi della Varianza) ad una via, completate con il test di Dunnet. Sono stati considerate significative le differenze con  $p < 0,05$ .

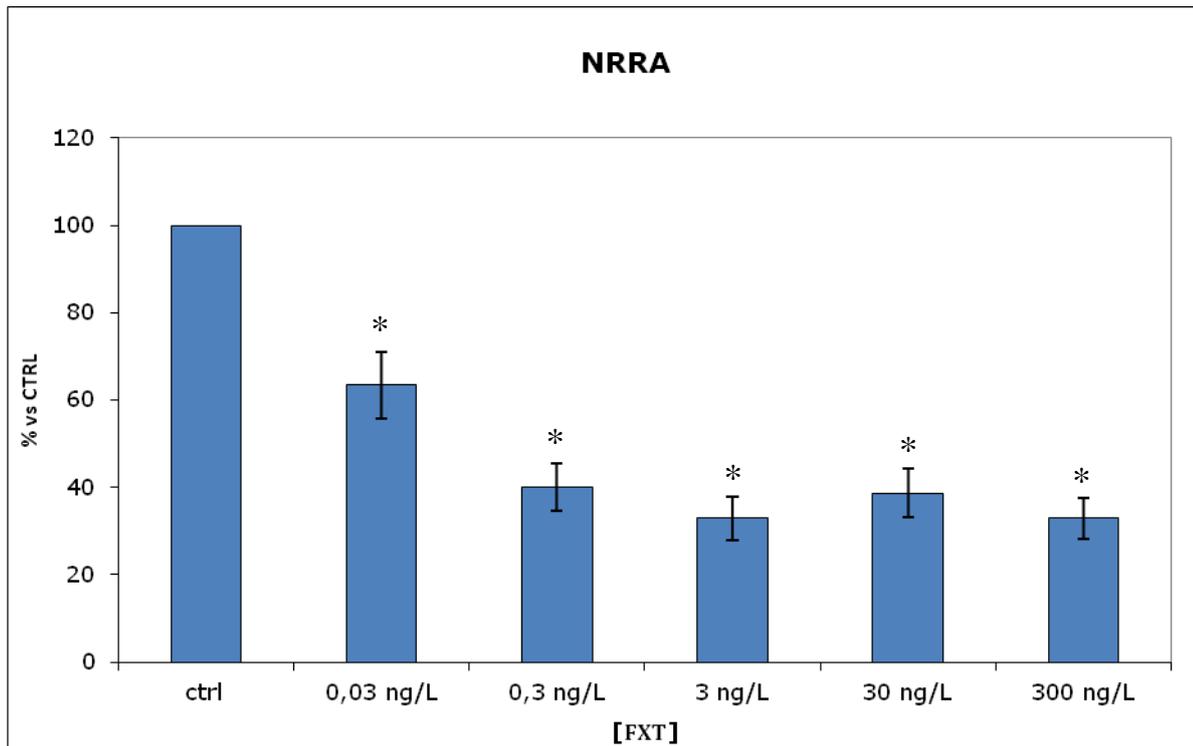


# Cap.4

## RISULTATI



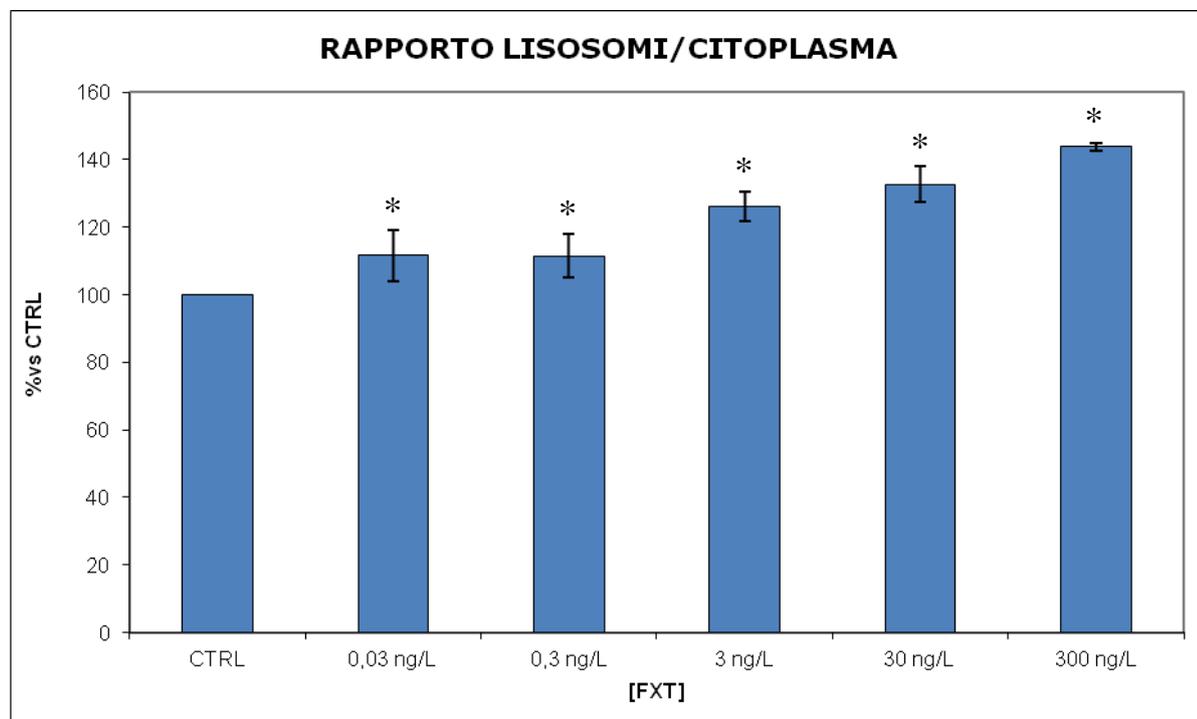
#### 4.1 NEUTRAL RED RETENTION ASSAY



**Figura 4.1: Stabilità delle membrane lisosomiali negli emociti dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle cinque concentrazioni di fluoxetina.  
\*: $p < 0,01$  rispetto al controllo.**

La stabilità delle membrane lisosomiali si ottiene valutando i tempi di ritenzione del colorante rosso neutro (neutral red) all'interno dei lisosomi contenuti negli emociti dei molluschi. Nella figura 4.1 il tempo di ritenzione relativo agli organismi di controllo (110 min) è stato preso come riferimento (100%) e i tempi relativi agli organismi esposti sono espressi in termini di percentuale rispetto al controllo stesso. Alla concentrazione inferiore di fluoxetina (0,03 ng/L) si ha un valore di circa 63%, in quella di 0,3 ng/L si ha un valore di circa 40%, nella 3 ng/L si ha un 32%, nella 30 ng/L 39% ed infine, il valore relativo alla concentrazione massima di esposizione, 300 ng/L è stato stimato essere di circa 33%. L'analisi statistica (ANOVA) ha riscontrato una differenza significativa ( $p < 0,01$ ) tra gli organismi di controllo e quelli esposti a tutte le concentrazioni di Fluoxetina.

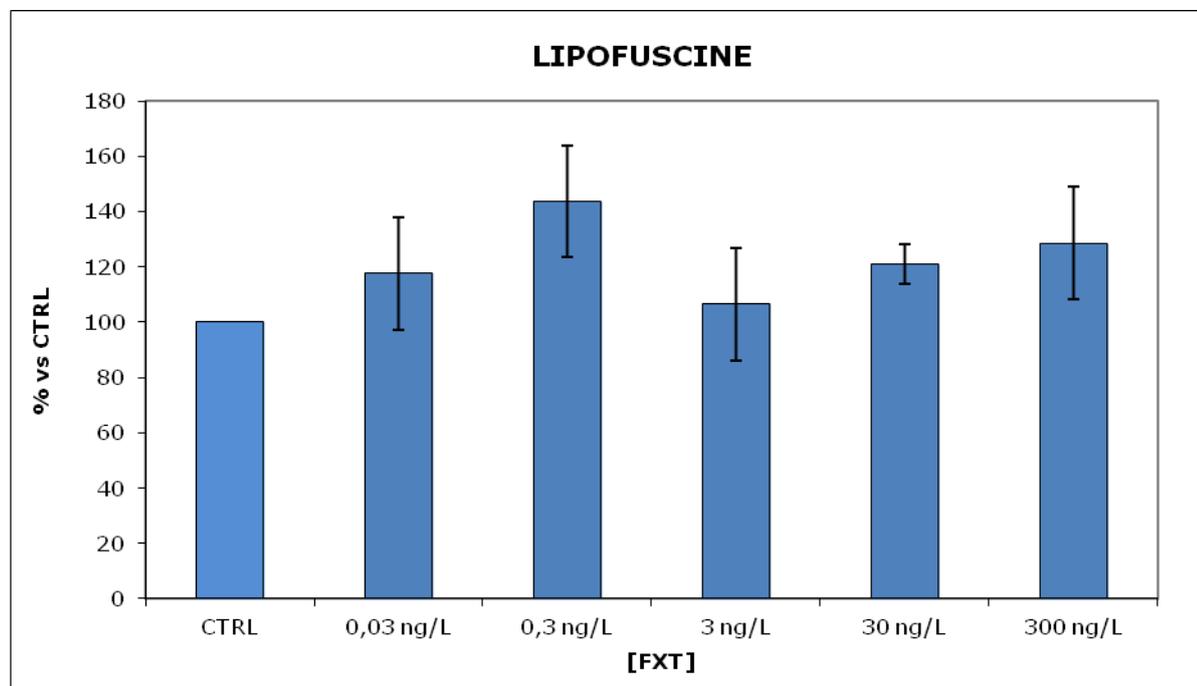
## 4.2 RAPPORTO LISOSOMI/CITOPLASMA



**Figura 4.2: Rapporto lisosomi/citoplasma nelle ghiandole digestive dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle cinque concentrazioni di fluoxetina.**  
\*: $p < 0,05$  rispetto al controllo.

I valori stimati dall'analisi del rapporto lisosomi/citoplasma nella figura 4.2 sono espressi in percentuale rispetto al controllo. Partendo dal valore di 100% del controllo si osservano valori crescenti al crescere della concentrazione di esposizione. (0,03 ng/L: 111,6 %; 0,3 ng/L:111,6%; 3 ng/L:126,1%; 30 ng/L:132,8%; 300ng/L: 143,8%), ovvero i lisosomi tendono a diventare via via più grandi occupando una parte sempre maggiore della dimensione della cellula. L'aumento dei valori relativi a tutte le concentrazioni rispetto al controllo è significativo statisticamente ( $p < 0,05$ ). Il significato dell'andamento crescente del biomarker verrà illustrato nel capitolo successivo.

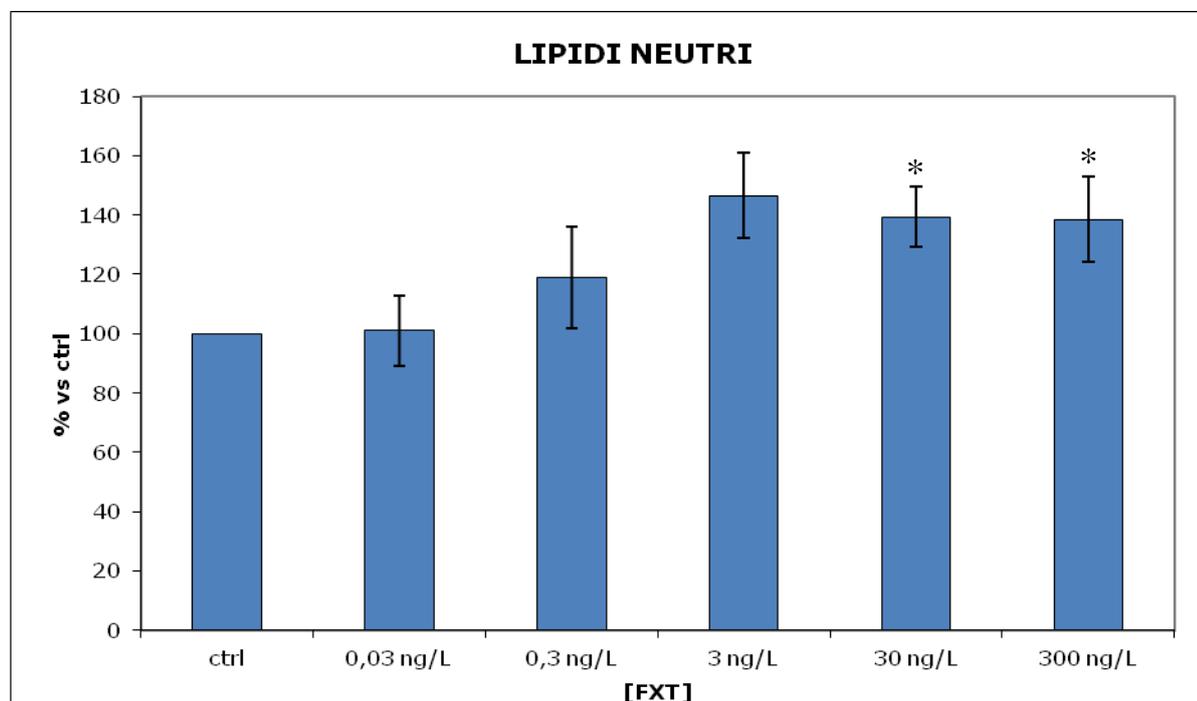
### 4.3 ACCUMULO DI LIPOFUSCINE



**Figura 4.3: Accumulo di lipofuscine nelle ghiandole digestive dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle cinque concentrazioni di fluoxetina.**

I valori stimati dall'analisi dell'accumulo delle lipofuscine mostrati nella figura 4.3 sono espressi in percentuale rispetto al controllo. I valori di base riflettono l'estensione delle aree colorate con il reattivo di Schmorl corrispondenti alle lipofuscine, e sono espressi in unità arbitrarie. I valori relativi alle concentrazioni (0,03 ng/L: 117,7 %; 0,3 ng/L:143,6%; 3 ng/L:106,5%; 30 ng/L:121,2%; 300ng/L: 128,6%) mostrano un andamento crescente rispetto al controllo tranne che per la concentrazione 3 ng/L che assume un valore simile al valore di controllo. Tuttavia, le differenze tra i valori dei mitili esposti e di controllo non sono statisticamente significative. .

#### 4.4 ACCUMULO DI LIPIDI NEUTRI

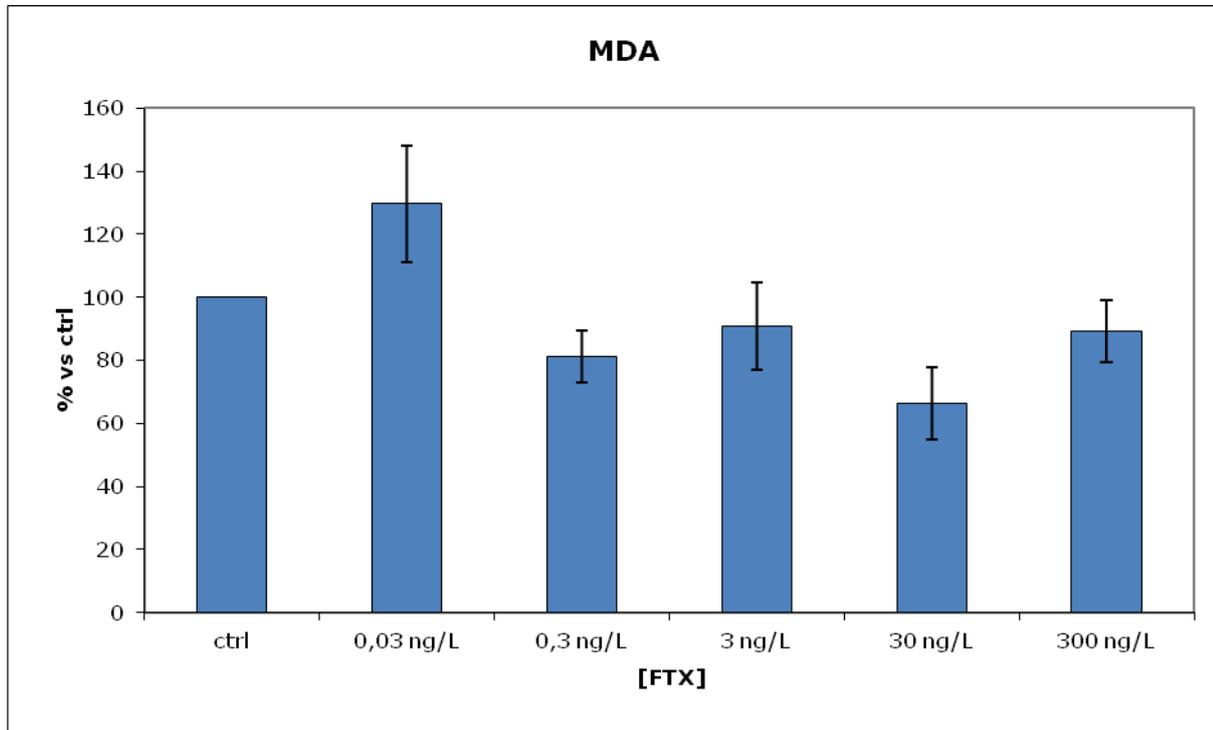


**Figura 4.4: Accumulo dei lipidi neutri nelle ghiandole digestive dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle cinque concentrazioni di fluoxetina.**

**\*:p<0,05 rispetto al controllo.**

I valori stimati dall'analisi dell'accumulo dei lipidi neutri mostrati nella figura 4.4 sono espressi in percentuale rispetto al controllo. I valori di base riflettono l'estensione delle aree colorate con Oil red corrispondenti ai lipidi neutri, e sono espressi in unità arbitrarie. I valori relativi alle concentrazioni (0,03 ng/L: 101,1 %; 0,3 ng/L:119%; 3 ng/L:146,6%; 30 ng/L:139,3%; 300ng/L: 138,5%) mostrano un andamento crescente rispetto al controllo a partire dalla concentrazione 0,3 ng/L. Infatti, nella 0,03 ng/L si ha un valore molto simile al controllo. Statisticamente si ha significatività (p<0,05) nel confronto tra esposti e controllo solo alle concentrazioni 30 ng/L e 300 ng/L.

#### 4.5 DETERMINAZIONE DELLA MALONDIALDEIDE (MDA)

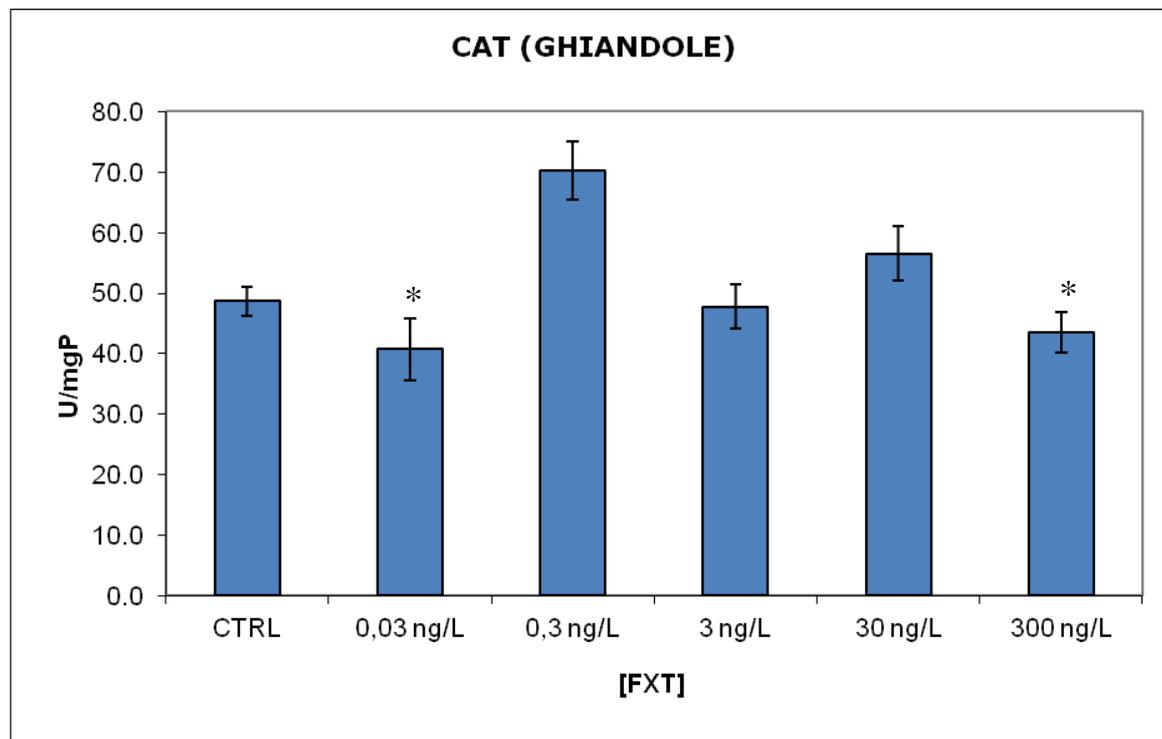


**Figura 4.5: Malondialdeide nelle ghiandole digestive dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle cinque concentrazioni di fluoxetina**

La quantità di malondialdeide presente nelle ghiandole digestive dei mitili è espressa in valori percentuali rispetto al controllo, come si vede dalla figura 4.5. Il valore di MDA nel controllo corrisponde a  $22 \pm 3$  nmol/mg proteine. Si nota che solo il valore alla concentrazione 0,03 ng/L (129,6%) è superiore al controllo, mentre dalla concentrazione 0,3 ng/L si hanno valori inferiori (0,3 ng/L: 81%; 3 ng/L: 90,8%; 30 ng/L: 66,4%; 300 ng/L: 89,2%). Il test ANOVA ha escluso la presenza di differenze significative tra i valori relativi ai mitili esposti a concentrazioni di fluoxetina e i mitili di controllo.

## 4.6 DETERMINAZIONE ATTIVITÀ DELLA CATALASI

### 4.6.1 ATTIVITA' DELLA CATALASI NELLE GHIANDOLE DIGESTIVE

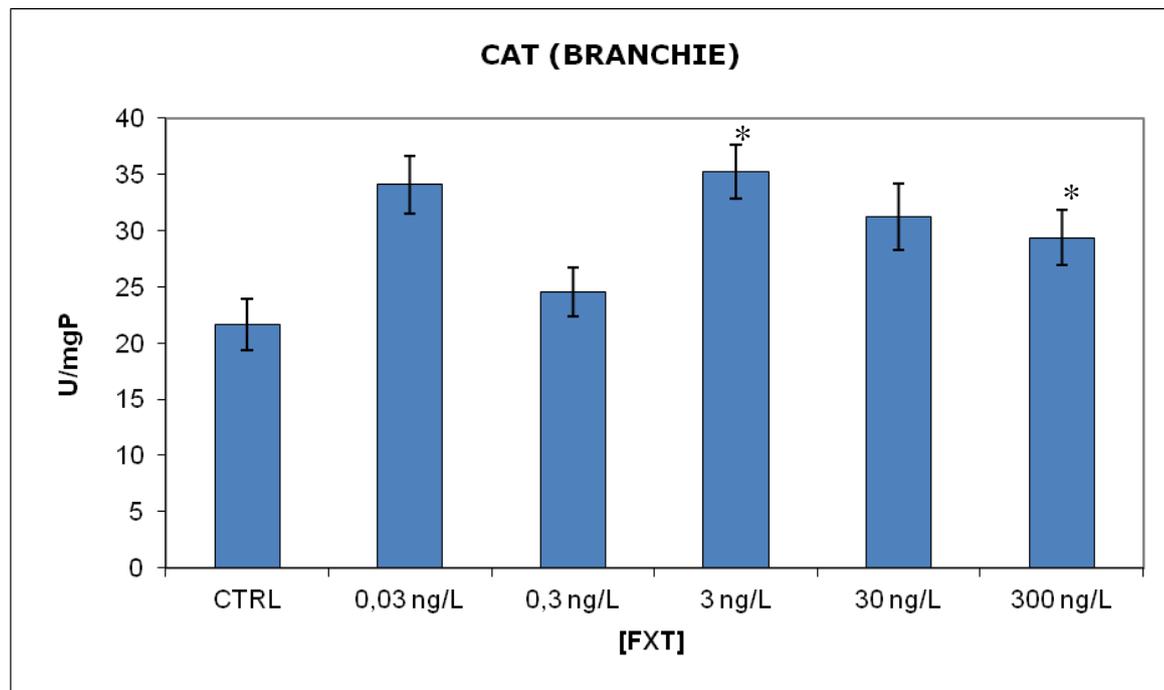


**Figura 4.6.1: Attività della catalasi nelle ghiandole digestive dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle cinque concentrazioni di fluoxetina.**

**\*:p<0,05 rispetto al controllo.**

I valori dell'attività enzimatica della catalasi riscontrati nelle ghiandole sono espressi in U/mgP (figura 4.6.1). I valori relativi alle attività enzimatiche nei mitili esposti alle concentrazioni 0,03 ng/L (40,7 U/mgP), 3 ng/L (47,8 U/mgP) e 300 ng/L (43,6 U/mgP) sono inferiori al valore dell'attività nei mitili di controllo (48,7 U/mgP), mentre alle concentrazioni 0,3 ng/L (70,3 U/mgP) e 30 ng/L (56,5 U/mgP) sono superiori. Tuttavia, l'analisi statistica ha evidenziato una differenza significativa ( $p < 0,05$ ) solo nei confronti tra le concentrazioni 0,03 ng/L e 300 ng/L ed i controlli.

#### 4.6.2 ATTIVITA' DELLA CATALASI NELLE BRANCHE

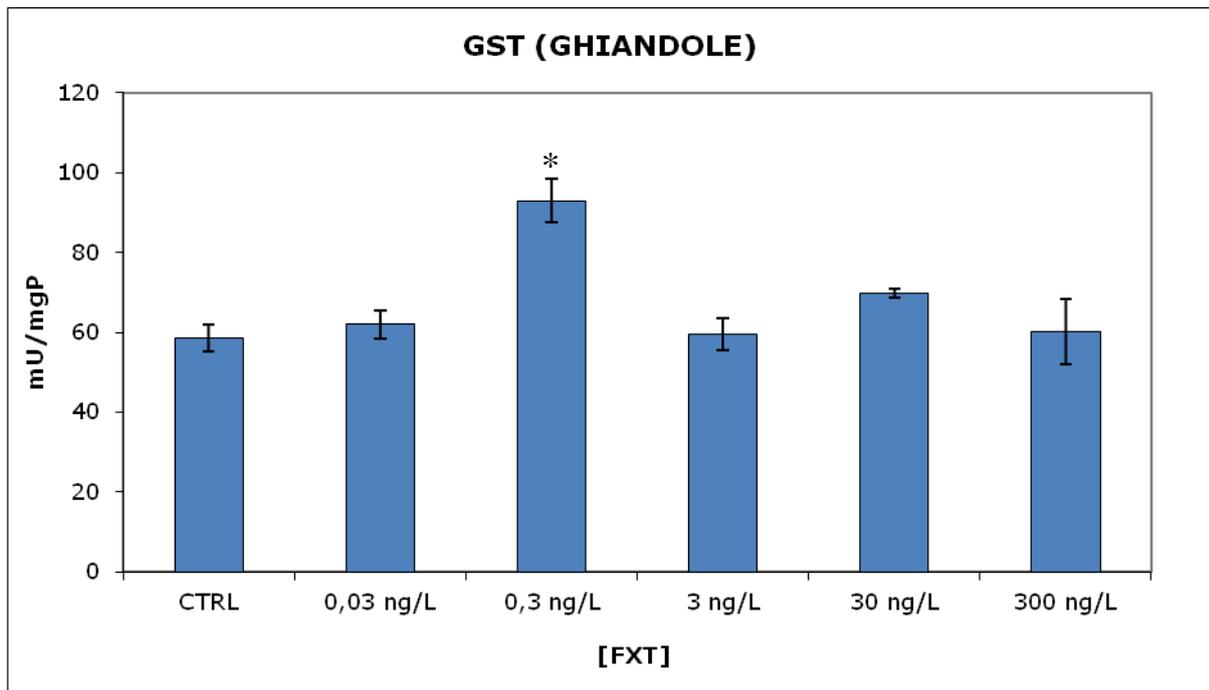


**Figura 4.6.2: Attività della catalasi nelle branchie dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle cinque concentrazioni di fluoxetina.**  
\*: $p < 0,05$  rispetto al controllo.

I valori dell'attività enzimatica della catalasi riscontrati nelle branchie sono espressi in U/mgP (figura 4.6.1). Nell'istogramma si nota che tutti i valori relativi alle attività della catalasi nelle branchie dei mitili esposti al farmaco (0,03 ng/L: 34,0 U/mgP; 0,3 ng/L: 24,5 U/mgP; 3 ng/L: 35,2U/mgP; 30ng/L: 31,1U/mgP; 300ng/L: 29,3U/mgP) sono maggiori del valore di controllo (21,6 U/mgP). Dall'analisi statistica però, risulta che solo le differenze relative alle concentrazioni 3 e 300 ng/L sono significative ( $p < 0,05$ ).

## 4.7 DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELLA GLUTATIONE S-TRANSFERASI (GST)

### 4.7.1 ATTIVITA' DELLA GST NELLE GHIANDOLE DIGESTIVE

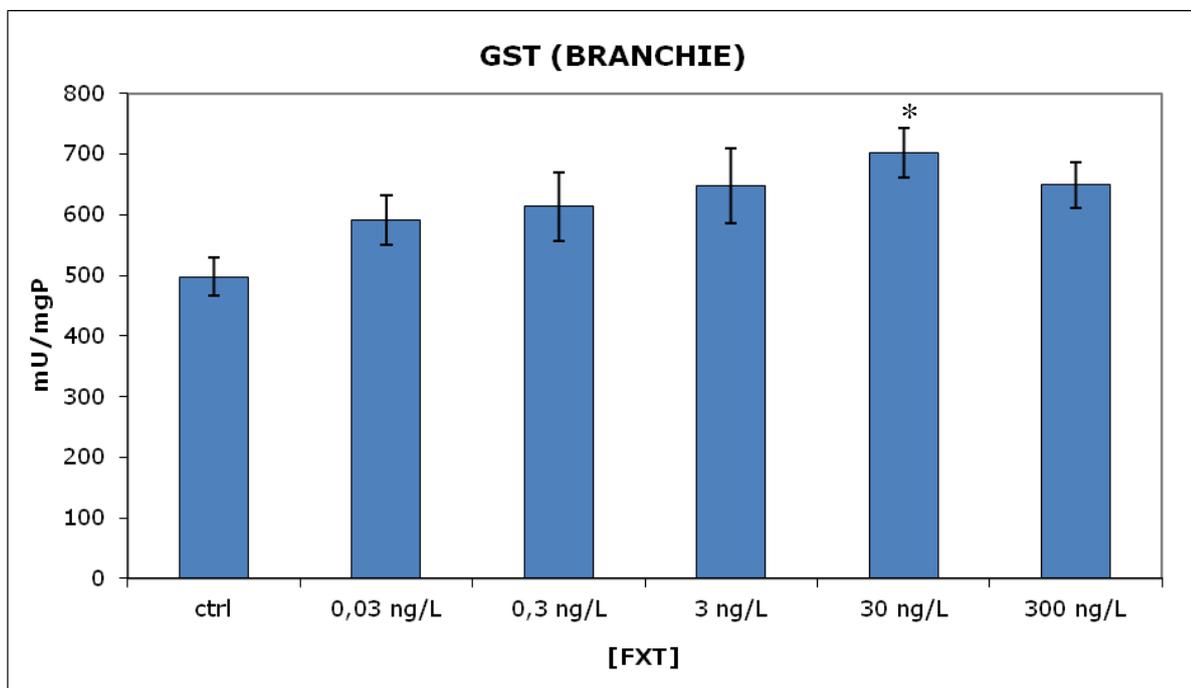


**Figura 4.7.1: Attività della GST nelle ghiandole digestive dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle cinque concentrazioni di fluoxetina.**

**\*:p<0,05 rispetto al controllo.**

I valori dell'attività enzimatica della GST riscontrati nelle ghiandole sono espressi in mU/mgP (figura 4.7.1). Dal grafico si notano dei valori relativi alle attività nei mitili esposti alla fluoxetina simili a quelli relativi al controllo, eccetto che per la concentrazione 0,3 ng/L per la quale si ha un valore (93,0 mU/mgP) relativamente elevato rispetto al controllo (58,6 mU/mgP). La statistica conferma la previsione grafica, infatti solo per il valore dell'attività relativo alla concentrazione 0,3 ng/L si ha una differenza significativa ( $p<0,05$ ).

#### 4.7.2 GST NELLE BRANCIE



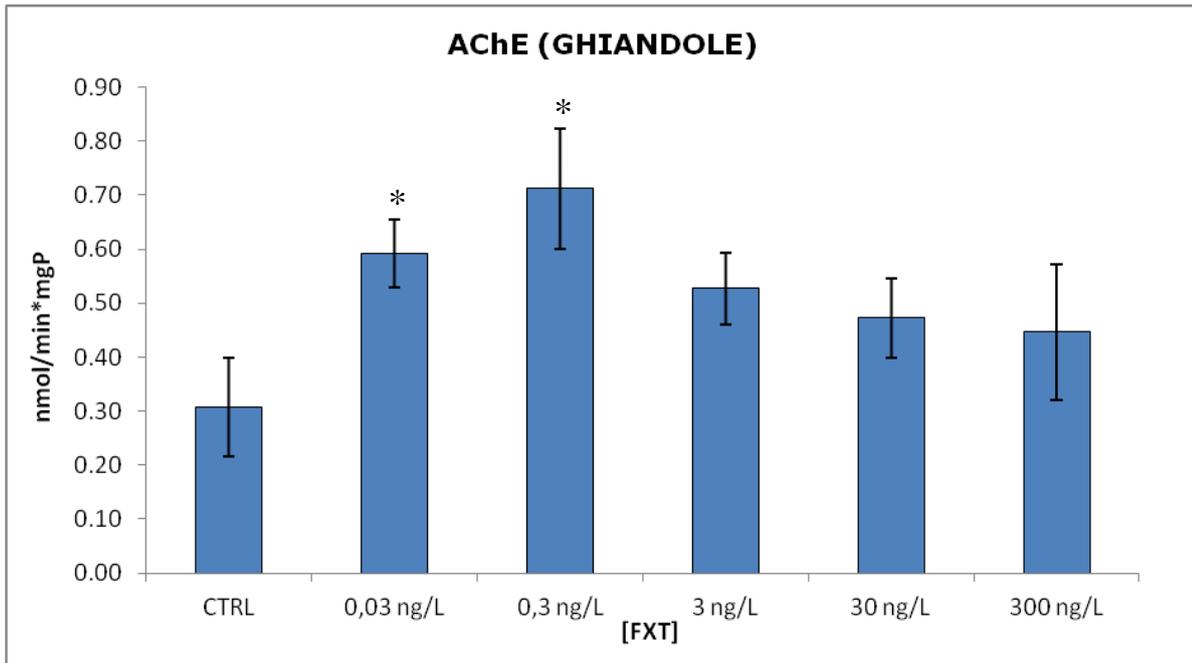
**Figura 4.7.2: GST nelle branchie dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle cinque concentrazioni di fluoxetina.**

**\*:p<0,05 rispetto al controllo.**

I valori dell'attività enzimatica della GST riscontrati nelle branchie sono espressi in mU/mgP (figura 4.7.1). Dal grafico si nota un andamento crescente delle attività enzimatiche relative al controllo (497,4 ng/L) e alle concentrazioni 0,03 ng/L(591,1 mU/mgP), 0,3ng/L (613,2 mU/mgP), 3ng/L (646,7 mU/mgP) e 30 ng/L (702,0 mU/mgP) con un'inversione di tendenza nell'ultima concentrazione 300 ng/L (648,7 mU/mgP). Si osserva significatività statistica (p<0,05), rispetto al controllo, solo alla concentrazione di fluoxetina 30 ng/L.

## 4.8 DETERMINAZIONE ATTIVITÀ DELL' ACETILCOLINESTERASI (AChE)

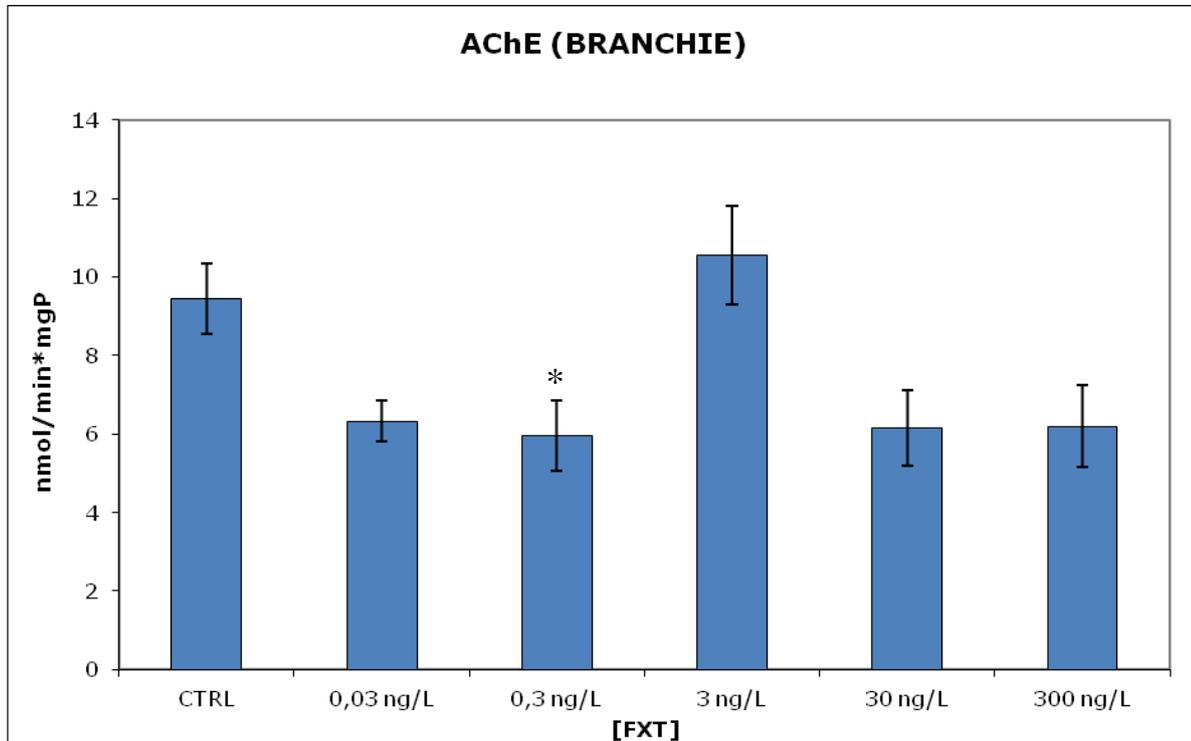
### 4.8.1 ATTIVITA' DELL' AChE NELLE GHIANDOLE DIGESTIVE



**Figura 4.8.1: Attività della AChE nelle ghiandole digestive dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle cinque concentrazioni di fluoxetina.  
\*: $p < 0,05$  rispetto al controllo**

I valori dell'attività enzimatica della AChE riscontrati nelle ghiandole digestive sono espressi in nmol/min\*mgP (figura 4.8.1). L'istogramma si presenta con un tipico andamento 'a campana' crescente fino al valore di concentrazione di 0,3 ng/L e decrescente dalla 3 ng/L in poi. L'analisi statistica indica come significative ( $p < 0,05$ ) le differenze nei valori relativi alle concentrazioni 0,03 e 0,3 ng/L rispetto ai controlli.

#### 4.8.2 AChE NELLE BRANCHE



**Figura 4.8.1: AChE nelle branchie dei mitili di controllo e dei mitili esposti alle cinque concentrazioni di fluoxetina.**

**\*:p<0,05 rispetto al controllo.**

I valori dell'attività enzimatica della AChE riscontrati nelle branchie sono espressi in nmol/min\*mgP (figura 4.8.1). I valori relativi alle attività enzimatiche dei mitili esposti risultano essere tutti inferiori al valore dell'attività nei mitili di controllo. Solo nel caso della concentrazione 3 ng/L si ha un valore maggiore che però non è statisticamente significativo. Infatti, l'analisi statistica indica come significativa ( $p<0,05$ ) la differenza tra i valori relativi alla concentrazione 0,3 ng/L e il controllo. Si noti come l'attività dell'AChE nelle branchie è molto superiore a quella delle ghiandole digestive.

## 4.9 SISTEMA ESPERTO

	CONTROL	0,03 ng/L	0,3 ng/L	3 ng/L	30 ng/L	300ng/L
<b>Livello di Stress</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>
<b>Presenza di xenobiotici organici</b>	NO	NO	NO	NO	NO	NO
<b>Effectti Genotossici</b>	NO	NO	NO	NO	NO	NO
<b>Presenza di metalli pesanti</b>	NO	NO	NO	NO	NO	NO

**Fig.4.9 Correlazione tra Biomarker effettuata mediante sistema esperto**

I livelli di stress per ogni concentrazione di esposizione sono espressi in termini di classi. Nei mitili di controllo e in quelli esposti alla 0,03 ng/L si ha una tossicità A. Alla concentrazione 0,3 ng/L si ha una classe di assegnazione B e nelle ultime tre concentrazioni 3, 30 e 300 ng/L si è ottenuto un valore C. Non si ha tossicità di classe D e E.



Cap.5

**DISCUSSIONE  
E CONCLUSIONI**



I farmaci sono molecole disegnate e commercializzate per avere effetti specifici negli organismi attraverso determinati meccanismi d'azione. Gli effetti terapeutici spesso sono accompagnati da effetti, definiti collaterali, negli organismi che assumono direttamente i medicinali per lungo tempo o in alte dosi. Effetti non specifici, ma comunque a detrimento dello stato di salute, possono insorgere anche negli organismi non-bersaglio che vengono a contatto con i residui ed i metaboliti dei farmaci in ambiente. Come descritto nei capitoli precedenti, il seguente lavoro di tesi si è basato sull'esposizione di organismi (detti 'sentinella') alla Fluoxetina, un farmaco antidepressivo appartenente alla classe degli inibitori selettivi del re-uptake della Serotonina (neurotrasmettitore principalmente coinvolto nella regolazione dell'umore) a concentrazioni pari a **0,03; 0,3; 3; 30; 300 ng/L**, vale a dire un range che va dalle concentrazioni ambientali a quelle rinvenute nelle acque reflue. La natura del farmaco e il meccanismo d'azione che ne permette l'efficacia possono dar luogo ad una serie di effetti negli organismi esposti. In generale, si possono avere alterazioni dovute sia all'azione diretta della fluoxetina che all'aumento delle concentrazioni di serotonina nelle sinapsi dovuto alla mancata ricaptazione della stessa. Non sono presenti in letteratura studi sugli effetti della fluoxetina nei mitili *Mytilus galloprovincialis*, tuttavia sono stati realizzati in altri organismi acquatici quali pesci (Moon, 2009); in particolare questi autori hanno osservato una diminuzione delle lipoproteine plasmatiche, della captazione del colesterolo da parte delle cellule e della sintesi di testosterone. Questi effetti sono inattesi e ben differenti da quelli terapeutici della fluoxetina osservati nell'uomo.

Le analisi effettuate mediante la batteria di Biomarker hanno prodotto i seguenti esiti: Si nota una diminuzione dei tempi di ritenzione del colorante all'interno dei lisosomi degli emociti dei mitili esposti a tutte le concentrazioni di Fluoxetina (Fig.4.1). Tale andamento decrescente è da considerare statisticamente significativo ( $p < 0,01$ ) in seguito al test dell'ANOVA ad una via completato con il test di Dunnet. I tempi di ritenzione bassi del colorante sono correlati ai tempi di destabilizzazione delle membrane lisosomiali e indicano condizioni di stress di tipo ossidativo

(Viarengo *et al.*, 2007). Per stress ossidativo si intende il verificarsi di effetti dovuti alla tossicità dell'ossigeno, in particolare, delle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), note anche come intermedi reattivi dell'ossigeno, radicali liberi dell'ossigeno o ossido radicali. Nelle reazioni del metabolismo aerobico l'utilizzo dell'ossigeno molecolare ( $O_2$ ) comporta la produzione di piccole quantità del radicale anione superossido ( $O_2^-$ ), del perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ), e del radicale idrossile ( $HO^\cdot$ ), potenti ossidanti capaci di reagire con macromolecole cellulari causando inattivazione di enzimi, perossidazione lipidica, danni al DNA, fino alla morte cellulare (Winston and Di Giulio, 1991). La formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), se non contrastata da meccanismi di difesa cellulare, è seguita dal loro ingresso all'interno dei lisosomi nei quali provocano danni a livello di membrana. Per questo la stabilità delle membrane lisosomiali è considerata un ottimo indicatore degli effetti dovuti all'esposizione di organismi ad agenti tossici (Moore *et al.*, 2004). I lisosomi sono piccoli organelli sferici presenti all'interno degli emociti, ma presenti in tutte le cellule, in grado di accumulare al loro interno sostanze tossiche ed inquinanti svolgendo importanti funzioni, come la digestione di residui intracellulari, la sottrazione di sostanze tossiche dall'ambiente cellulare, la detossificazione da sostanze xenobiotiche e partecipano alle risposte immunitarie dell'organismo (Bocchetti *et al.*, 2006). La presenza di stress dimostrata dalla stabilità lisosomiale può essere confermata dalla correlazione con altri biomarker. Infatti, è evidente una relazione inversa con il rapporto lisosomi/citoplasma (Fig.4.2), il quale ha un andamento crescente statisticamente significativo per ogni concentrazione. Tale comportamento può essere spiegato dal fatto che i lisosomi, in condizioni di stress, tendono ad aumentare le proprie dimensioni fondendosi tra loro e fagocitando lipofuscine e lipidi neutri (prodotti in condizioni di stress e fagocitati in seguito all'attivazione di un meccanismo di difesa cellulare), facendo aumentare in questo modo il valore del rapporto tra lisosomi e citoplasma (Moore *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2008). Può essere interessante correlare anche i risultati della stabilità lisosomiale con quelli dell'accumulo delle lipofuscine (Fig.4.3) e dei lipidi neutri (Fig.4.4). In entrambi i casi, così come per il rapporto lisosomi/citoplasma, si hanno valori relativi maggiori rispetto ai controlli a seguito della

esposizione a fluoxetina. Tuttavia, nel caso dell'accumulo di lipofuscine tali differenze non sono significative dal punto di vista statistico, mentre nei lipidi neutri si ha significatività solo alle concentrazioni più alte 30 e 300 ng/L. Le lipofuscine sono aggregati di lipoproteine, metalli e sostanze tossiche prodotti nelle cellule esposte a contaminanti e in generale a stress ossidativo (Viarengo, 1989); a seguito degli stessi fattori di stress la cellula accumula anche i lipidi neutri. L'accumulo di queste sostanze nel citoplasma è un indicatore di stress indotto dall'esposizione di un organismo a sostanze tossiche.

Un altro biomarker utilizzato nella batteria in esame è il test della malondialdeide (MDA), un composto che si forma come prodotto intermedio nei processi di perossidazione lipidica. Considerando i risultati ottenuti (fig.4.5), dal diagramma si nota un aumento della concentrazione di malondialdeide nelle ghiandole digestive dei mitili esposti alla concentrazione di fluoxetina di 0,03 ng/L mentre si hanno valori inferiori al controllo alle concentrazioni maggiori. Un tale trend crescente e poi decrescente, fa presumere che ci sia stato, alla concentrazione minore, un aumento di MDA dovuto a condizioni di stress e poi, con l'aumentare delle concentrazioni, lo stress sia aumentato provocando la trasformazione della malondialdeide nei prodotti finali della perossidazione lipidica (lipofuscine). Anche in questo caso, così come per la stabilità lisosomiale, può essere utile confrontare i risultati della MDA con quelli riguardanti l'accumulo di lipofuscine e lipidi neutri. Infatti, si nota una correlazione negativa tra i valori, ovvero si hanno concentrazioni maggiori di malondialdeide alle concentrazioni in cui si hanno gli accumuli minori di lipofuscine e lipidi neutri. Ciò confermerebbe l'interpretazione fatta in precedenza.

Ulteriori analisi hanno riguardato la valutazione delle attività enzimatiche, nelle ghiandole digestive e nelle branchie, degli enzimi CAT (catalasi), GST (glutazione S transferasi) e AChE (acetilcolinesterasi). La catalasi è un enzima presente nei perossisomi coinvolto nei processi di detossificazione cellulare, catalizza la conversione del perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) ad acqua ( $H_2O$ ) e ossigeno ( $O_2$ ). L'attività della Catalasi nelle ghiandole digestive dei mitili tende ad aumentare in

condizioni di stress indotte dall'esposizione alla fluoxetina. In realtà, osservando i risultati (fig. 4.6.1) si nota un aumento dell'attività, rispetto al controllo, solo alle concentrazioni 0,3; 3 e 30 ng/L che però non raggiunge la significatività, mentre si hanno attività inferiori e significative alle concentrazioni 0,03 e 300 ng/L. Una situazione differente si è verificata, invece, stimando l'attività enzimatica nelle branchie dove, come noto nei mitili, si hanno valori di attività inferiori rispetto a quelli relativi alle ghiandole. In questo caso, a tutte le concentrazioni si osservano attività che superano quella misurata nei mitili di controllo ma solo a due concentrazioni (3 e 300 ng/L) si hanno differenze significative rispetto al controllo (fig. 4.6.2).

Analogamente alla catalasi, per l'attività della GST (enzima che catalizza le reazioni di coniugazione di xenobiotici con il glutatione ridotto, GSH) nelle ghiandole dei mitili esposti era prevedibile, in accordo con i risultati nel NRRA, un aumento rispetto al controllo. Effettivamente, sia nelle ghiandole digestive che nelle branchie si hanno valori di attività enzimatica maggiori negli organismi esposti che in quelli di controllo (fig. 4.7.1 e 4.7.2). In entrambi i tessuti, però, solo una concentrazione risulta essere maggiore in maniera significativa rispetto al controllo, nelle ghiandole si ha significatività a 0,3 ng/L, mentre nelle branchie si ha significatività a 30 ng/L, ovvero le concentrazioni che presentano i valori massimi di attività.

Il terzo saggio enzimatico ha riguardato la determinazione dell'attività dell'acetilcolinesterasi (AChE), un enzima che catalizza l'idrolisi del neurotrasmettitore acetilcolina con produzione di colina e acetato. Il saggio è stato svolto sia nelle ghiandole che nelle branchie e, come previsto, ha dimostrato valori maggiori di attività enzimatica nelle branchie rispetto alle ghiandole. Nei risultati ottenuti in queste ultime (Fig.4.8.1), si nota un andamento dell'attività 'a campana' molto accentuato, nonostante i valori siano bassi (in un intervallo da 0,30 a 0,70 nmol/min\*mgP). Si ha significatività statistica solo nella porzione crescente iniziale del grafico, alle prime due concentrazioni (0,03 e 0,3 ng/L). Gli andamenti a campana sono tipici delle risposte enzimatiche che vengono stimulate alle basse concentrazioni di sostanza tossica, e poi inibiti all'aumentare della

sostanza stessa (Viarengo *et al.*, 2007).. In realtà, data la bassa attività dell'enzima nella ghiandola digestiva, non sembra che questo tessuto sia adatto per valutare la riduzione dell'attività dell'AChE come biomarker di neurotossicità. Nelle branchie si hanno valori di attività enzimatica di circa dieci ordini di grandezza maggiori rispetto a quelli stimati nelle ghiandole digestive (Fig.4.8.2). In questo caso, nei mitili esposti si hanno attività minori rispetto al controllo tranne che per la concentrazione 3 ng/L la cui differenza rispetto al controllo non risulta significativa. Infatti, l'unica differenza significativa si ha in corrispondenza della concentrazione 0,3 ng/L. I risultati nelle branchie sono interpretabili come un'inibizione dell'attività enzimatica, che indica un disturbo neurotossico indotto dalla fluoxetina.

A conclusione della fase sperimentale, si è usato un Sistema Esperto per una interpretazione integrata, ma non soggettiva, delle risposte dei biomarker (Fig.4.9). Il Sistema Esperto fornisce una risposta organizzata in 5 classi crescenti di stress, A, B, C, D, ed E. Lo stress dovuto all'esposizione alla fluoxetina viene classificato di classe A, ovvero nullo, nei controlli e alla concentrazione 0,03 ng/L. E' di classe B, cioè debole negli organismi esposti alla concentrazione 0,3 ng/L, e C cioè medio per le concentrazioni 3, 30 e 300 ng/L. Non si sarebbe raggiunto in ogni caso uno stress classificabile come E in quanto non abbiamo inserito nella batteria degli indicatori di patologie a livello dell'intero organismo. Non abbiamo utilizzato biomarker di genotossicità, pertanto non abbiamo una risposta al quesito. Dato che l'esperimento era volto alla esposizione a fluoxetina, non abbiamo utilizzato alcun biomarker specifico per i metalli pesanti (metallotioneine), pertanto non abbiamo una risposta al quesito. Nei mitili non è possibile misurare l'attività dell'EROD, pertanto non c'è risposta specifica al quesito relativo alla presenza di xenobiotici organici.

CONCLUSIONE: Come noto, gli effetti tossici causati dall'esposizione degli organismi agli inquinanti può essere valutata a diversi livelli dell'organizzazione biologica. Gli strumenti classici applicati nella valutazione della qualità ambientale sono i bioassays e i parametri ecologici, che

tuttavia non sono in grado di identificare gli effetti precoci della risposta allo stress alla base di successivi effetti che possono culminare con la morte. Gli studi sulla fase precoce dell'alterazione hanno un ruolo molto importante nella determinazione dei livelli di vulnerabilità raggiunti dalla fauna acquatica quando non vi siano evidenti modifiche negli endpoint convenzionali, e per far questo si usano batterie di biomarker subletali valutati in organismi sentinella. Nel presente lavoro noi li abbiamo applicati ad uno studio in ambiente controllato, in cui abbiamo esposti i mitili ad un farmaco noto per essere diffuso nell'ambiente acquatico. L'esposizione dei mitili alla fluoxetina, seppur della durata di 7 giorni, ha prodotto alterazioni allo stato fisiologico degli organismi. Tali alterazioni si sono verificate anche alle concentrazioni minori (concentrazioni ambientali) a differenza di quanto ipotizzato da molti autori sulla non tossicità dei farmaci a basse concentrazioni. I risultati maggiormente evidenti sono quelli relativi alla stabilità delle membrane lisosomiali, rafforzati dalla loro correlazione agli altri biomarker utilizzati. Data la dimostrata relazione tra la riduzione della stabilità delle membrane lisosomiali e l'investimento degli organismi nella crescita (scope for growth; Moore et al., 2006) questi dati indicano la elevata vulnerabilità dei mitili esposti alla fluoxetina, anche a bassa concentrazione. La dimostrata vulnerabilità degli animali può determinare una capacità inferiore di sopravvivere a successivi eventi di stress antropici o naturali, potendo portare in ultimo alla perdita di biodiversità.



Cap.6

# BIBLIOGRAFIA



- Aga DS. Fate of pharmaceuticals in the environment and in water treatment systems. Boca Raton: CRC Press; 2008.
- Alistair B.A. Boxall, Murray A. Rudd, Bryan W. Brooks, Daniel J. Caldwell, Kyungho Choi, Silke Hickmann, Elizabeth Innes, Kim Ostapyk, Jane P. Staveley, Tim Verslycke, Gerald T. Ankley, Karen F. Beazley, Scott E. Belanger, Jason P. Berninger, Pedro Carriquiriborde, Anja Coors, Paul C. DeLeo, Scott D. Dyer, Jon F. Ericson, François Gagné, John P. Giesy, Todd Gouin, Lars Hallstrom, Maja V. Karlsson, D. G. Joakim Larsson, James M. Lazorchak, Frank Mastrocco, Alison McLaughlin, Mark E. McMaster, Roger D. Meyerhoff, Roberta Moore, Joanne L. Parrott, Jason R. Snape, Richard Murray-Smith, Mark R. Servos, Paul K. Sibley, Jürg Oliver Straub, Nora D. Szabo, Edward Topp, Gerald R. Tetreault, Vance L. Trudeau, Glen Van Der Kraak. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What are the Big Questions?. Environ Health Perspect. 2012 Sep;120(9):1221-9.
- Alonso SG, Catalá M, Maroto RR, Rodríguez JLG, Miguel AG, Valcárcel Y. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the rivers of Madrid metropolitan area (Spain). Environ Int 2010;36:195–201.
- Altamura, A.C., Moro, A.R., Percudani, M., 1994. Clinical pharmacokinetics of fluoxetine. Clin. Pharmacokinet. 26, 201-214.
- Banni, M., Dondero, F., Jebali, J., Guerbej, H., Boussetta, H., Viarengo, A., 2007. Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coast. Biomarkers 12, 369-383.
- Barclay VKH, Tyreforsa NL, Johansson MI, Pettersson CE. Trace analysis of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. Part I: development of a chiral liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for wastewater samples. J Chromatogr A 2011;1218:5587–96.

- Barnes KK, Kolpin DW, Furlong ET, Zaugg SD, Meyer MT, Barber LB. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States—I) Groundwater. *Sci Total Environ* 2008;402:192–200.
- Bartelt-Hunt SL, Snow DD, Damon T, Shockley J, Hoagland K. The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska. *Environ Pollut* 2009;157:786–91.
- Bayne WF, Hwang SS. General method for evaluating the fraction of the irreversible organ clearance due to conversion of drug to a primary metabolite. *J Pharm Sci.* 1985 Jul;74(7):722-6.
- Bedner M, MacCrehan WA. Reactions of the amine-containing drugs fluoxetine and metoprolol during chlorination and dechlorination processes used in wastewater treatment. *Chemosphere* 2006;65:2130–7.
- Berset JD, Brenneisen R, Mathieu C. Analysis of licit and illicit drugs in waste, surface and lake water samples using large volume direct injection high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Chemosphere* 2010;81:859–66.
- Bijlsma L, Sancho JV, Pitarch E, Ibáñez M, Hernández F. Simultaneous ultra high pressure liquid chromatography-mass spectrometry determination of amphetamine like stimulants, cocaine and its metabolites, and a cannabis metabolite in surface water and urban wastewater. *J Chromatogr A* 2009;1216:3078–89.
- Bocchetti R., Regoli F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65, 913–921.
- Boleda MR, Galceran MT, Ventura F. Trace determination of cannabinoids and opioids in wastewater and surface waters by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2007;1175:38–48.

- Bueno MJM, Uclés S, Hernando MD, Fernández-Alba AR. Development of a solvent free method for the simultaneous identification/quantification of drugs of abuse and their metabolites in environmental water by LC-MS/MS. *Talanta* 2011;85:157–66.
- Christensen, A.M., Markussen, B., Baun, A., Halling-Sorensen, B., 2009. Probabilistic environmental risk characterization of pharmaceuticals in sewage treatment plant discharges. *Chemosphere* 77, 351-358.
- Cunha, E.M., Machado, J., 2001. Parturition in *Anodonta cygnea* induced by selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Can J Zool* 79, 95-100
- Dagnino A, Allen JI, Moore MN, Broeg K, Canesi L, Viarengo A. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers*. 2007 Mar-Apr;12(2):155-72.
- Dagnino A, Sforzini S, Dondero F, Fenoglio S, Bona E, Jensen J, Viarengo A. A "weight of evidence" approach for the integration of environmental "triad" data to assess ecological risk and biological vulnerability. *Integr Environ Assess Manag*. 2008 Jul;4(3):314-26.
- Daughton CG. Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. I. Rationale for and avenues toward a green pharmacy. *Environ Health Perspect* 2003;11:757-74.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle changes? *Environ. Health Perspect.* 107, 907-938.
- Depledge, M.H., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In *non-destructive Biomarkers in vertebrates*, eds Fossi, M. C. and Leonzio C.. Lewis Publisher, Boca Raton, Florida.
- Donnini, F., Dinelli, E., Sangiorgi, F., Fabbri, E., 2007. A biological and geochemical integrated approach to assess the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy). *Environ. Int.* 33, 919-928.

- Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95.: 88-95.
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA CHMP. GUIDELINE ON THE ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT OF MEDICINAL PRODUCTS FOR HUMAN USE, 2006. Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/4447/00 corr 1\*
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA CPMP. 2001. Discussion paper on environmental risk assessment of nongenetically modified organism (non-GMO) containing medicinal products for human use. CPMP/SWP/ 4447/00 draft.
- European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EMEA CHMP. 2005. Guideline on the environmental risk assessments of medicinal products for human use. CHMP/SWP/4447/00 draft.
- Fent K., Weston A.A., Caminada D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 76, 122-159.
- Fick J, Söderström H, Lindberg RH, Phan C, Tysklind M, Larsson DGJ. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ Toxicol Chem* 2009;28:2522–7.
- Fong, P.P., Duncan, J., Ram, J.L., 1994. Inhibition and sex specific induction of spawning by serotonergic ligands in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Experientia* 50, 506-509.
- Fong, P.P., Wade, S., Rostafin, M., 1996. Characterization of serotonin receptor mediating parturition in fingernail clams *Sphaerium* (*Musculium*) spp. from eastern North America. *J Exp Zool* 275, 326-330.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2011. The  $\beta$ -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 101, 299-308.

- Fuller, R.W., Snoddy, H.D., Krushinski, J.H., Robertson, D.W., 1992. Comparison of norfluoxetine enantiomers as serotonin uptake inhibitors in vivo. *Neurpharmacology* 31, 997-1000
- Gheorghe A, van Nuijs A, Pecceu B, Bervoets L, Jorens PG, Blust R, et al. Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2008;391:1309–19.
- Gibbons, M.C., Castagna, M., 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture* 40, 189-191.
- González-Mariño I, Quintana JB, Rodríguez I, Cela R. Determination of drugs of abuse in water by solid phase extraction, derivatisation and gas chromatography ion trap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2010;1217:1748–60.
- Gosling, E. M., 1985. The systematic status of *Mytilus galloprovincialis* in western Europe: a review. *Malacologia*, 25, 551-568.
- Gros M, Petrovic M, Barceló D. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Anal Chem* 2009;81:898–912.
- Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H.C., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review, *Chemosphere* 36, 357-393.
- Hedgespeth ML, Sapozhnikova Y, Pennington P, Clum A, Fairey A, Wirth E. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in treated wastewater discharges into Charleston Harbor, South Carolina. *Sci Total Environ.* 2012 Oct 15;437:1-9. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.07.076. Epub 2012 Aug 17.
- Hiemke, C., Härtter, S., 2000. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol. Therapeut.* 85, 11-28.

- Hirai, S., Kishimoto, T., Kadam, A.L., Kanatani, H., Koide, S.S., 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *J Exp Zool* 245, 318-321.
- Huber, M. M.; Canonica, S.; Park, G. Y.; Gunten, U. V.; *Environ. Sci. Technol.* 2003, 37, 1016.
- Huerta-Fontela M, Galceran MT, Ventura F. Ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of stimulatory drugs of abuse in wastewater and surface water. *Anal Chem* 2007;79:3821–9.
- Huerta-Fontela M, Galceran MT, Martin-Alonso J, Ventura F. Occurrence of psychoactive stimulatory drugs in wastewaters in north-eastern Spain. *Sci Total Environ* 2008a;397:31–40.
- Huerta-Fontela M, Galceran MT, Ventura F. Stimulatory drugs of abuse in surface waters and their removal in a conventional drinking water treatment plant. *Environ Sci Technol* 2008b;42:6809–16.
- Huerta-Fontela M, Galceran MT, Ventura F. Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Res* 2011;45:1432–42.
- Hummel D, Löffler D, Fink G, Ternes TA. Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 2006;40:7321–8.
- José Luiz Tambosi, Leonardo Yassuhiro Yamanaka, Humberto Jorge José e Regina de Fátima Peralta Muniz Moreira. RECENT RESEARCH DATA ON THE REMOVAL OF PHARMACEUTICALS FROM SEWAGE TREATMENT PLANTS (STP). *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 2, 411-420, 2010.
- JRC Scientific and Technical Report- Marine Strategy Framework Directive, Task Group 8 Report, Contaminants and pollution effects. Pp. 1-171. Edited by European Union and ICES, 2010.

- Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2008;391:1293–308.
- Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res* 2009;43:363–80.
- Khanal SK, Xie B, Thompson ML, Sung S, Ong SK, Van Leeuwen J. Fate, transport, and biodegradation of natural estrogens in the environment and engineered systems. *Environ Sci Technol*. 2006 Nov 1;40(21):6537-46. Review.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999–2000: a national reconnaissance. *Environ Sci Technol* 2002;36:1202–11.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M, Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance, *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202-1211
- Kosjek T, Heath E. Tools for evaluating selective serotonin re-uptake inhibitor residues as environmental contaminants. *Trends Anal Chem* 2010;29:832–47.
- Lajeunesse A, Gagnon C, Sauve S. Determination of basic antidepressants and their N-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2008;80:5325–33.
- Lindqvist N, Tuhkanen T, Kronberg L. Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Res* 2005;39:2219–28.
- Loganathan B, Phillips M, Mowery H, Jones-Lepp TL. Contamination profiles and mass loadings of macrolide antibiotics and illicit drugs from a small urban wastewater treatment plant. *Chemosphere* 2009;75:70–7.

- Lowe, D.M., Pipe, R.K., 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: as in vitro study. *Aquat. Toxicol.* 30, 357-365.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Martin-Diaz,L.,Franzellitti,S.,Buratti,S.,Valbonesi,P.,Capuzzo,A.,Fabbri,E., 2009. Effect of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarker and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 94, 177-185
- Martin-Diaz,L.,Franzellitti,S.,Buratti,S.,Valbonesi,P.,Capuzzo,A.,Fabbri,E., 2009. Effect of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarker and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 94, 177-185.
- McCarthy, J.F., Halbrook, R.S., Shugart, L.R., 1991. Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarker based biomonitoring capability. Publication no. 3072, ORNL/TM- 11783. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.
- Mengoli, A., 1998. Aspetti morfo-funzionali dei mitili. *Laguna* 4, 13-19.
- Metcalfe C, Chu S, Judt C, Li H, Ken DO, Servos MR, et al. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed.*Environ Toxicol Chem* 2010;29:79–89.
- Miege C, Choubert JM, Ribeiro L, Eusebe M, Coquery M. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants conception of a database and first results. *Environ Pollut* 2009;157:1721–6.
- Mimeault, C., Trudeau, V.L., Moon, T.W., 2006. Waterborne gemfibrozil challenges the hepatic antioxidant defense system and down-regulates peroxisome proliferator-activated

- receptor beta (PPARbeta) mRNA levels in male goldfish (*Carassius auratus*). *Toxicology* 228, 140-150.
- Moore M.N., 2008. Autophagy as a secondal level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Landes Bioscience*. 4(2), 254-256.
  - Moore M.N., 2008. Autophagy as a secondal level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. *Landes Bioscience*. 4(2), 254-256.
  - Moore M.N., Icarus Allen J., McVeigh A. 2006. Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. *Marine Environmental Research* 61, 278–304.
  - Moore M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Leonard, D.R.P., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental managment. *Mutation Research*. 552, 247-268.
  - Moore M.N., Viarengo, A., Donkin, P., and Hawkins, A.J.S., 2007. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. *Aquatic. Toxicol.* 84, 80-91.
  - Oakes, D.K., Coors, A., Escher, B.I., Fenner, k., Garric, J., Gust, M., Knacker, T., Ku"ster, A., Kussatz, C., Metcalfe, C.D., Monteiro, S., Moon, T.W., Mennigen, J., Parrott, J., Pèry, A.R.P., Ramil, M., Roennefahrt, I., Tarazona, J.V., Sàncchez-Arguello, P., Ternes, T.A., Trudeau, V.L., Boucard, T., Van Der Kraak, G.J. and Servosy M.R., 2011. Environmental Risk Assessment for the Serotonin Re-uptake Inhibitor Fluoxetine: Case Study Using the European Risk Assessment Framework. *Integrated Environmental Assessment and Management* 6, 524-539.
  - Pal R, et al, Illicit drugs and the environment—A review, *Sci Total Environ* (2012), doi:10.1016/j.scitotenv.2012.05.086
  - Pearse, A.G.E. 1972 *Histochemistry, theoretical and applied*, vol. 2. London: Churchill-Livingstone.

- Postigo C, de Alda MJL, Barceló D. Drugs of abuse and their metabolites in the Ebro river basin: occurrence in sewage and surface water, sewage treatment plants removal efficiency, and collective drug usage estimation. *Environ Int* 2010;36:75–84.
- Radjenović J, Petrović M, Barceló D. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Res.* 2009 Feb;43(3):831-41. Epub 2008 Dec 7.
- Ram, J.L., Crawford, G.W., Walker, J.U., Mojares, J.J., Patel, N., Fong, P.P., Kyojuka, K., 1993. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Activation by internal or external application of serotonin. *J Exp Zool* 265, 587-598.
- Säfholm M, Norder A, Fick J, Berg C. Disrupted oogenesis in the frog *Xenopus tropicalis* after exposure to environmental progestin concentrations. *Biol Reprod.* 2012 Apr 27;86(4):126. Print 2012 Apr.
- Santos, L.H., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater* 175(1-3), 45-95
- Schultz MM, Furlong ET, Kolpin DW, Werner SL, Schoenfuss HL, Barber LB, et al. Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: occurrence and fate in water and sediment, and selective uptake in fish neural tissue. *Environ Sci Technol* 2010;44:1918–25.
- SchultzMM, Furlong ET. Trace analysis of antidepressant pharmaceuticals and their select degradates in aquatic matrixes by LC/ESI/MS/MS. *Anal Chem* 2008;80:1756–62.
- Silva LJ, Lino CM, Meisel LM, Pena A., Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: An ecopharmacovigilance approach.
- Stebbing, A. R. D., Dethlefsen, V. (1992). Introduction to the Bremerhaven Workshop on Biological Effects of Contamination. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91: 1-8
- Stockholm County Council. Environmentally classified pharmaceuticals, 2006.

- Stumpf M, Ternes TA, Wilken R, Rodrigues SV, Baumann W. Polar drug residue in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Sci Total Environ* 1999;225:135–41.
- Suarez S, Lema JM, Omil F. Pre-treatment of hospital wastewater by coagulation-flocculation and flotation. *Bioresour Technol.* 2009 Apr;100(7):2138-46. Epub 2008 Dec 23.
- Taggart MA, Cuthbert R, Das D, Sashikumar C, Pain DJ, Green RE, Feltrer Y, Shultz S, Cunningham AA, Meharg AA. Diclofenac disposition in Indian cow and goat with reference to Gyps vulture population declines. *Environ Pollut.* 2007 May;147(1):60-5.
- Ternes TA. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res* 1998;32:3245–60.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). Final report: the environmental occurrence, fate, and ecotoxicity of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in aquatic environments. Available at [http://cfpub.epa.gov/ncer\\_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.abstractDetail/abstract/175/report/F2007](http://cfpub.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.abstractDetail/abstract/175/report/F2007). Accessed on 10.01.2012.
- Valcárcel Y, Martínez F, González-Alonso S, Segura Y, Catalá M, Molina R, et al. drugs of abuse in surface and tap waters of the Tagus river basin: heterogeneous photo-Fenton process is effective in their degradation. *Environ Int* 2012;41:35–43.
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2003 Feb;13(2):57-149.
- van Nuijs ALN, Pecceu B, Theunis L, Dubois N, Charlier C, Jorens PG, et al. Cocaine and metabolites in waste and surface water across Belgium. *Environ Pollut* 2009c;157:123–9.
- Vasskog T, Anderssen T, Pedersen-Bjergaard S, Kallenborn R, Jensen E. Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. *J Chromatogr A* 2008;1185:194–205.

- Vassog, T., Anderssen, T., Pedersen-Bjergaard, S., Kallenborn, R., Jensen, E., 2008. Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. *J. Chromatogr.* 1185A, 194-205.
- Vazquez-Roig P, Andreu V, Blasco C, Picó Y. SPE and LC-MS/MS determination of 14 illicit drugs in surface waters from the natural park of L'Albufera (València, Spain). *Anal Bioanal Chem* 2010;397:2851–64.
- Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci. Review* 1, 295-317.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146, 281-300.
- Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Pro-oxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137–161.
- Wu C, Witter JD, Spongberg AL, Czajkowski KP. Occurrence of selected pharmaceuticals in an agricultural landscape, western Lake Erie basin. *Water Res* 2009;43:3407–16.
- Zabczynski S, Buntner D, Miksch K, Roig B. Performance of conventional treatment processes of the most resistant PPs. In: Benoit R, editor. *Pharmaceuticals in the environment: current knowledge and need assessment to reduce presence and impact*. London: IWA Publishing; 2010. p. 87-113.
- Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati R, Chiabrando C, Grassi P, Fanelli R. Illicit drugs, a novel group of environmental contaminants. *Water Res* 2008;42:961–8.
- Zuccato E, Castiglioni S, Fanelli R, et al. Risk related to the discharge of pharmaceuticals in the environment: further research is needed. In: *Pharmaceuticals in the environment*. Second edition. K Kummered Ed. Berlin, Springer-Verlag, 2004.
- Zuccato E, Castiglioni S. Illicit drugs in the environment. *Philos Trans R Soc A* 2009;367:3965–78.

- Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, Calamari D, Bagnati R, Schiarea S, et al. Cocaine in surface water: a new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environ Health Glob* 2005;4:14–20.