

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

SCUOLA DI SCIENZE
Corso di laurea Magistrale in Biologia Marina
Campus di Ravenna

**Alterazioni del sistema di trasduzione AMPc-
dipendente nel mitilo mediterraneo *Mytilus*
galloprovincialis esposto a fluoxetina**

Tesi di Laurea in Adattamenti degli Animali all'Ambiente Marino

Relatore:
Prof.ssa Elena Fabbri

Presentata da:
Marco Capolupo

Correlatore:
Dr.ssa Silvia Franzellitti

II sessione

Anno Accademico 2011-2012

INDICE

INDICE	1
1.INTRODUZIONE	3
1.1. LA CONTAMINAZIONE AMBIENTALE DA RESIDUI FARMACEUTICI.....	5
1.2. IL CONSUMO DI FARMACI	7
1.3. DINAMICHE DI CONTAMINAZIONE DEI CORPI IDRICI DA RESIDUI DI COMPOSTI FARMACEUTICI.....	10
1.4. CONCENTRAZIONI DEI FARMACI IN AMBIENTE ACQUATICI	11
1.5. LINEE GUIDA PER LA VALUTAZIONE DI RISCHIO AMBIENTALE	13
1.6. EFFETTI ECOTOSSICOLOGICI DEI FARMACI	16
1.7. LA FLUOXETINA	18
1.7.1. CONCENTRAZIONI DI FLUOXETINA NEI COMPARTI IDRICI.....	18
1.7.2. BIOACCUMULO DI FLUOXETINA NEI TESSUTI DEGLI ORGANISMI ACQUATICI	20
1.7.3. MECCANISMO D'AZIONE DELLA FLUOXETINA	21
1.7.4. PROCESSI BIOLOGICI REGOLATI DAL SISTEMA NERVOSO SEROTONINERGICO	22
1.7.5. EFFETTI ECOTOSSICOLOGICI DELLA FLUOXETINA	23
1.8. LE TAPPE FONDAMENTALI DELLA COMUNICAZIONE CHIMICA	25
1.9. IL SISTEMA NERVOSO SEROTONINERGICO	26
1.9.1. IL RUOLO DEI RECETTORI SEROTONINERGICI NELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE NERVOSO	26
1.9.1.1 L'ESPRESSIONE DEI RECETTORI 5HT NEI MOLLUSCHI.....	29
1.10. LA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE AMP-CICLICO DIPENDENTE	30
1.10.1. LE PROTEINE G: STRUTTURA E FUNZIONI	31
1.10.2. L'ADENILIL CICLASI	33
1.10.3. LA PKA	34

1.11. LA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE AMP-CICLICO DIPENDENTE NEI MOLLUSCHI BIVALVI	36
1.11.1. IL COMPLESSO DELL'ADENILIL CICLASI NEI MOLLUSCHI BIVALVI	36
1.11.2. LA PKA NEI MOLLUSCHI BIVALVI	37
1.12. LA P-GLICOPROTEINA E LA MULTI XENOBIOTIC RESISTANCE NEI MOLLUSCHI BIVALVI	39
2. SCOPO DELLA RICERCA	43
3. MATERIALI E METODI.....	47
3.1. ANATOMIA DI <i>Mytilus galloprovincialis</i>	49
3.2. ESECUZIONE DELL'ESPERIMENTO	50
3.3. LIVELLI DI AMP-ciclico	51
3.3.1. PRINCIPIO DEL METODO	51
3.3.2. PREPARAZIONE DEI CAMPIONI ED ESECUZIONE DEL SAGGIO	51
3.4. ATTIVITA' DELLA PROTEIN CHINASI AMP _c -DIPENDENTE (PKA).....	52
3.5. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI PGP E RECETTORI 5HT MEDIANTE PCR SEMI-QUANTITATIVA REAL TIME.	54
3.5.1. ESTRAZIONE DELL'RNA	54
3.5.2 RETROTRASCRIZIONE	54
3.5.3. Real Time PCR	55
3.6. ANALISI STATISTICA	63
4. RISULTATI	65
4.1 VARIAZIONE DEI LIVELLI DI AMP _c	67
4.2 ATTIVITA' DELLA PROTEIN CHINASI AMP _c DIPENDENTE (PKA).....	68
4.3. ESPRESSIONE DEL GENE ABCB1 CODIFICANTE PER LA P- GLICOPROTEINA (Pgp)	69
4.4 ESPRESSIONE GENICA DEL RECETTORE 5HTMyt1	70
4.5. CORRELAZIONE DEI DATI	71
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	73
6. BIBLIOGRAFIA	85
7. RINGRAZIAMENTI	105

1.INTRODUZIONE

1.1. LA CONTAMINAZIONE AMBIENTALE DA RESIDUI FARMACEUTICI

In ambito terapeutico l'utilizzo di sostanze bioattive rappresenta la parte essenziale della medicina umana e veterinaria. Dalla scoperta casuale della penicillina in poi, la società medica ha sviluppato una serie di composti finalizzati non soltanto alla prevenzione e terapia delle patologie umane e animali, ma anche a sostenere lo stile di vita moderno, con l'introduzione di contraccettivi per uso orale e prodotti per la cosmesi o per l'igiene personale. Il crescente aumento dei consumi, soprattutto nei paesi industrializzati, ha tuttavia generato alcune criticità nella gestione di queste sostanze. Gli studi di cinetica dei farmaci in particolare, dimostrano con certezza che essi, seppur metabolizzati, mantengono inalterato il loro potere d'azione, rimanendo biodisponibili. Una volta escreti dall'organismo confluiscono attraverso i sistemi di collettamento, nelle acque superficiali, bypassando, per la loro natura chimica, le ritenzione nei sistemi di depurazione dei reflui.

La valutazione degli effetti che la loro presenza può provocare sulla qualità dei sistemi di approvvigionamento idrico e sulla biologia degli organismi tipici dei comparti idrici riceventi, classifica i farmaci come una nuova classe di "inquinanti emergenti". Con tale definizione si fa riferimento a contaminanti di recente interesse scientifico per cui non sono ancora state introdotte adeguate contromisure in ambito legislativo. I farmaci sono sostanze biologicamente attive, dall'elevata solubilità e persistenza in ambiente acquatico. Si tratta di molecole studiate per avere effetti specifici sugli organismi per cui ne è contemplato l'utilizzo, ma che possono esercitare le proprie funzioni anche su organismi non target, ovvero quelli per cui l'esposizione al farmaco è considerata casuale.

L'aumento delle conoscenze sulla resistenza dei farmaci ai processi di depurazione si deve soprattutto al miglioramento delle tecnologie di analisi, nonché alla messa a punto di tecniche in grado di rilevare molecole polari anche se presenti in tracce. Sino alla fine degli anni '90 la gas cromatografia associata alla spettrofotometria di massa (GC-MS) era il metodo analitico maggiormente utilizzato per l'analisi dei residui dei farmaci in ambiente (*Stan et al., 1994*). Successivamente si è passati all'uso accoppiato di cromatografia liquida e spettrofotometria di massa (HPLC – MS). Le due tecniche, usate di concerto, permettono di identificare composti organici polari nell'ordine di ng/L con

maggiore precisione e sensibilità. Anche tale metodo è stato successivamente perfezionato grazie all'utilizzo di spettrofotometrie ad elettrospray e con l'introduzione dell'elettroforesi capillare (CE – MS) (*Hirsch et al.*, 1998, *Ternes et al.*, 2001; *Ahrer et al.*, 2001; *Kolpin et al.*, 2002; *Fent et al.*, 2006). L'elevata persistenza in ambiente acquatico e la presenza di tracce di diversi farmaci pone l'accento sui possibili effetti antagonisti o sinergici che i farmaci possono esercitare sugli organismi quando presenti in miscela.

Quello costiero rientra tra gli ecosistemi maggiormente esposti ai rischi di alterazione da effetti farmaceutici. Per molto tempo si è pensato che l'ingente diluizione a cui sono soggetti i residui che sversano in mare dai sistemi di scarico dei reflui urbani o dal bacino idrografico, mettesse al riparo la qualità delle funzioni ecosistemiche dai rischi relativi all'attività dei farmaci sulla comunità biologica costiera. Tuttavia tale assunto non considera che i farmaci sono progettati per avere effetti anche a bassissime concentrazioni e la loro caratteristica persistenza in ambiente acquatico rappresenta un rischio concreto di accumulo nelle zone con scarso ricambio idrico come baie e lagune. Inoltre studi recenti hanno dimostrato che in realtà i composti di più comune utilizzo possano contaminare in maniera molto più copiosa di quanto ipotizzato le acque costiere raggiungendo in alcuni casi, concentrazioni superiori ai 5 µg/l (*Zou et al.*, 2011)

Nonostante le concentrazioni di farmaci in ambiente acquatico siano ormai note da tempo, le conoscenze relative agli effetti dei residui farmaceutici sugli organismi acquatici sono ad oggi ancora molto limitate. A partire dalla fine degli anni 90 l'impiego di test ecotossicologici finalizzati ad ottenere acquisizioni in tal senso sono stati incentivati dal crescente interesse delle istituzioni al tema del mantenimento della resilienza e della tutela delle funzioni degli ecosistemi acquatici. Essendo i farmaci molecole disegnate per interagire con particolari recettori bersaglio regolandone l'attività in funzione della terapia, la valutazione di ecotossicità dei farmaci non può prescindere dalle conoscenze riguardanti la fisiologia degli animali esposti, così da poterne determinare la suscettibilità. In letteratura sono noti soprattutto gli effetti acuti dei farmaci su specie acquatiche appartenenti a diversi livelli trofici. Questi hanno escluso la possibilità che le basse dosi ambientali potessero avere effetti sugli organismi (*Fent et al.*, 2006). In ragione di ciò gli studi più recenti sono per lo più indirizzati alla valutazione degli effetti ecotossicologici causati dai farmaci a seguito di un'esposizione a lungo termine in organismi appartenenti a

specie non target (*Franzellitti et al., 2011; Contardo-Jara et al., 2011*). Tale approccio è certamente più coerente con le condizioni ambientali alle quali sono sottoposte le specie costiere fluviali od estuarine, le quali il più delle volte sono esposte alle fonti di contaminazione per tutta la durata della loro vita.

Dunque per poter essere in grado di definire adeguate normative in grado di arginare il fenomeno occorre integrare informazioni relative al meccanismo d'azione dei farmaci con le conoscenze circa i possibili effetti sugli organismi acquatici promuovendo, al contempo, l'introduzione di sistemi di depurazione studiati per la ritenzione di molecole polari.

1.2. IL CONSUMO DI FARMACI

Negli ultimi decenni le nuove scoperte mediche e il miglioramento dello stile di vita nei paesi occidentali hanno determinato un graduale e costante aumento del consumo di sostanze terapeutiche, nonché della gamma di prodotti farmaceutici e parafarmaceutici comunemente utilizzati.

Nei paesi appartenenti all'Unione Europea sono circa 3000 i farmaci utilizzati per la terapia umana. Tra essi trovano ampia applicazione antinfiammatori, analgesici, antibiotici, beta-bloccanti, regolatori lipidici, composti neuroattivi e molti altri, tra cui i già citati composti contraccettivi (*Fent et al., 2006*). A questi si aggiungono altri prodotti destinati ad uso veterinario tra cui antinfiammatori e antibiotici, nonché immunostimolanti e, in ambito zootecnico, regolatori della crescita, il più delle volte di natura ormonale. Per dare un'idea complessiva di questo progressivo incremento basti pensare che il consumo di antibiotici in Europa è cresciuto da 10200 tonnellate nel 1996 a 16200 tonnellate nel 2000 (*Kümmerer, 2003*). Se consideriamo i dati mostrati da *Fent e coll.* nel 2006, presenti in Tabella 1.1 circa l'uso di farmaci nei paesi Europei si può osservare come esso vari in maniera sorprendente tra nazioni di diversi continenti.

Il dato più significativo riguarda senza dubbio l'utilizzo di acido acetilsalicilico (principio attivo dell'Aspirina) il cui consumo nel 1999 è stato registrato 902,27 tonnellate in Germania contro 24,9 t/y consumate in Australia. Una discrepanza all'apparenza così sorprendente può essere spiegata dall'abitudine all'utilizzo di molecole antinfiammatorie differenti da parte della popolazione Australiana, come ad esempio il paracetamolo che si

attesta infatti come il farmaco maggiormente prescritto in questo continente. Occorre anche notare che i dati riportati (*Fent et al., 2006*) fanno riferimento all'ammontare dei farmaci prescritti mentre non sono considerati quelli non prescritti e quelli acquistati via internet, pratica sempre più diffusa nei paesi industrializzati.

Tabella 1.1. Consumo annuale di differenti classi di farmaci in diverse nazioni (Ton/y) (*Fent et al., 2006*)

Compounds	Germany 1999 ^a	Germany 2000 ^a	Germany 2001 ^a	Austria 1997 ^b	Denmark 1997 ^c	Australia 1998 ^d	England 2000 ^e	Italy 2001 ^f	Switzerland 2004 ^g
Analgesics, antipyretics and anti-inflammatory									
Acetylsalicylic acid	902.27 (1)	862.60 (1)	836.26 (1)	78.45 (1)	0.21 (7)	20.4 (9)			43.80 (3)
Salicylic acid	89.70 (12)	76.98 (17)	71.67 (17)	9.57 (11)			390.9 (1)		5.30 (6)
Paracetamol	654.42 (2)	641.86 (2)	621.65 (2)	35.08 (2)	0.24 (6)	295.9 (1)			95.20 (1)
Naproxen				4.63 (16)		22.8 (7)	35.07 (12)		1.70 (12)
Ibuprofen	259.85 (5)	300.09 (5)	344.89 (5)	6.7 (13)	0.03 (19)	14.2 (13)	162.2 (3)	1.9 (15)	25.00 (4)
Diclofenac	81.79 (16)	82.20 (14)	85.80 (14)	6.14 (15)			26.12 (16)		4.50 (7)
β-Blocker									
Atenolol							28.98 (13)	22.07 (4)	3.20 (9)
Metoprolol	67.66 (18)	79.15 (16)	92.97 (11)	2.44 (20)					3.20 (10)
Antilipidemic									
Gemfibrozol						20 (10)		7.60 (8)	0.399 (18)
Bezafibrate				4.47 (17)					0.757 (15)
Neuroactive									
Carbamazepine	86.92 (13)	87.71 (13)	87.60 (12)	6.33 (14)	0.21 (8)	9.97 (18)	40.35 (8)		4.40 (8)
Diazepam									0.051 (21)
Antiacidic									
Ranitidine	85.41 (15)	89.29 (12)	85.81 (13)			33.7 (5)	36.32 (10)	26.67 (3)	1.60 (13)
Cimetidine							35.65 (11)		0.063 (20)
Diuretics									
Furosemide					3.74 (1)			6.40 (19)	1.00 (14)
Sympatomimetika									
Terbutalin					0.46 (3)				0.0099 (23)
Salbutamol					0.17 (9)				0.035 (22)
Various									
Metformin	368.01 (4)	433.46 (4)	516.91 (3)	26.38 (3)		90.9 (2)	205.8 (2)		51.40 (2)
Estradiol					0.12 (13)				
Iopromide	64.93 (19)	63.26 (19)	64.06 (19)						6.90 (5)

1.3. DINAMICHE DI CONTAMINAZIONE DEI CORPI IDRICI DA RESIDUI DI COMPOSTI FARMACEUTICI

Diversamente da tutte le altre tipologie di inquinanti, i farmaci presentano alta specificità verso i substrati biologici e, molto spesso, elevata persistenza in ambiente acquatico. Oltre a ciò, la loro progettazione prevede che essi abbiano una cinetica in grado di agire in maniera selettiva con i tessuti o le cellule che esercitano particolari funzioni biologiche. Pertanto la formulazione dei prodotti farmaceutici prevede una molecola attiva, definita appunto “Principio Attivo”, che svolge l’azione terapeutica vera e propria, e degli eccipienti studiati per regolare il rilascio del principio attivo dalla forma farmaceutica. Tuttavia i farmaci non sono mai completamente metabolizzati da parte dell’organismo. Parte di essi vengono escrete mantenendo attiva la loro funzione biologica. Inoltre spesso anche le molecole metabolizzate sono convertite in forme glucuronate o subiscono altri processi di coniugazione che aumentano la loro polarità senza alterarne il potere d’azione. Pertanto buona parte dei farmaci assunti viene eliminata dall’organismo in forma biologicamente attiva e dalle infrastrutture di collettamento dei reflui urbani giunge ai sistemi di depurazione (STP - Sewage Treatment Plant) in cui vengono attuati processi di depurazione tra i quali adsorbimento e biodegradazione. Il più delle volte l’inefficienza di questa fase è responsabile della presenza di composti farmaceutici nei sistemi idrici riceventi le acque in uscita dagli STP in quanto le proprietà intrinseche del farmaco e dei suoi metaboliti sono spesso tali da non consentirne l’eliminazione attraverso i convenzionali trattamenti delle acque reflue.

I sistemi di collettamento e depurazione dei reflui urbani civili o ospedalieri non rappresentano tuttavia l’unica fonte di contaminazione da farmaci. I trattamenti farmacologici impiegati negli allevamenti zootecnici non prevedono altresì alcun processo di sanificazione dei cataboliti. Nella maggior parte di casi le deiezioni animali sono impiegate a scopi concimatori delineando possibili contaminazioni delle derrate agroalimentari, nonché dei canali di drenaggio attraverso il dilavamento dei suoli ad opera delle acque piovane, per poi confluire verso le acque superficiali. Stesso destino può riguardare i residui di fabbricazione di industrie farmaceutiche e i farmaci smaltiti nelle discariche che possono raggiungere i percolati e resistere ai trattamenti di degradazione aerobica ed anaerobica. Come mostrato in Figura 1.1 , la persistenza dei farmaci può

comportare anche una rischiosa contaminazione delle acque riammesse all'uso previa depurazione (Holm et al., 1995; Ternes et al., 2001).

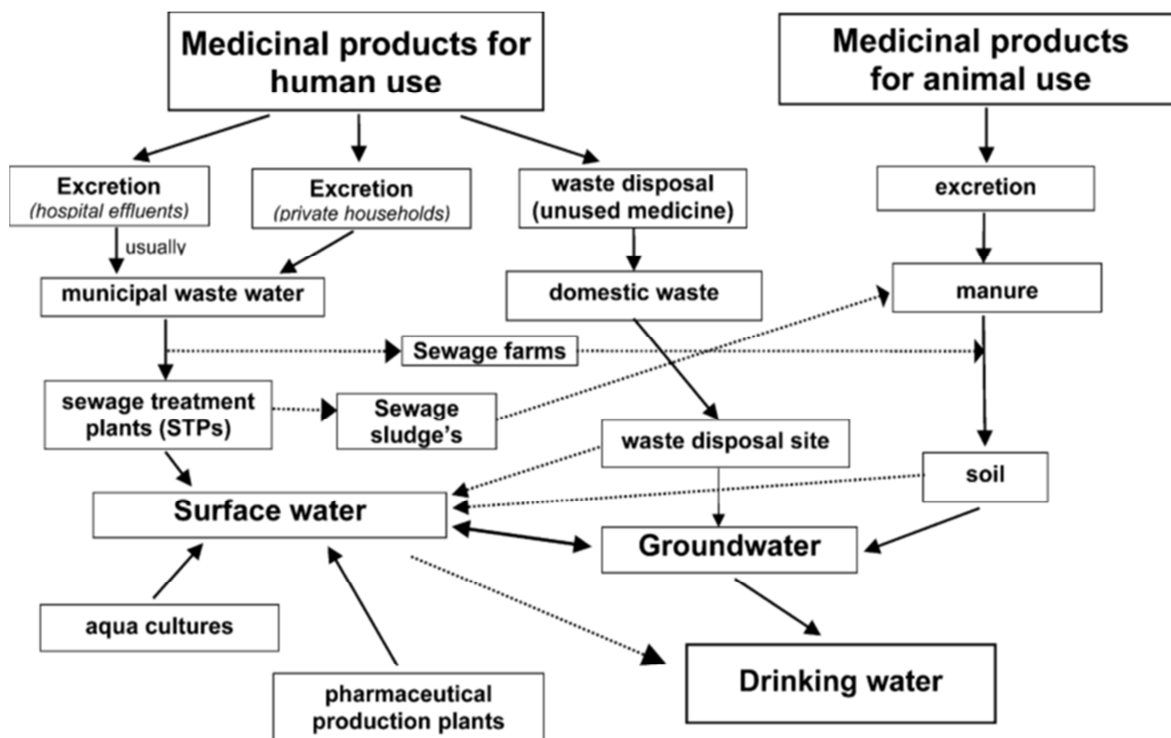


Figura 1.1. Schema illustrativo dei possibili pattern di contaminazione delle acque superficiali da parte di molecole farmaceutiche (Heberer, 2002)

Una volta giunti in ambiente acquatico i farmaci possono essere soggetti a fenomeni di degradazione di tipo fisico. La fotodegradazione, in particolare, si è dimostrata efficace nell'eliminazione di molecole processate solo marginalmente negli STP, come Carbamazepina e Acido Clofibrico. L'efficienza del processo di fotodegradazione è comunque influenzata in maniera rilevante dall'intensità delle radiazioni solari, nonché dalla stagione e dalla latitudine.

1.4. CONCENTRAZIONI DEI FARMACI IN AMBIENTE ACQUATICO

Un primo campanello d'allarme circa la possibilità che le acque depurate potessero contenere tracce di farmaci fu suonato nel 1976, anno in cui uno studio condotto da Garrison e coll., rivelò la presenza di Acido Clofibrico a concentrazioni nel range di 0.8-2 µg/l nelle acque depurate. Successivamente altri composti furono apprezzati nei comparti

fluviali della Gran Bretagna nel 1981 alla concentrazione di 1 µg/l e Ibuprofene e Naprossene furono identificati nel 1985 in Canada nelle acque di scarico (*Richardson e Brown, 1985; Rogers et al., 1986; Fent et al., 2006*). A queste, che fino ad allora potevano essere descritte come vere e proprie “scoperte” in ambito scientifico, fecero seguito diverse analisi chimiche che confermarono l’ampia distribuzione dei residui farmaceutici nelle acque superficiali. Le tecniche analitiche brevettate negli ultimi 15 anni hanno implementato qualità e precisione delle misurazioni permettendo di riconoscere composti polari di origine farmaceutica anche a bassissime concentrazioni.

I dati a disposizione in letteratura sono oggi in grado di darci un chiaro scenario della vasta gamma di farmaci comunemente riscontrati in ambiente. Circa 80-100 composti tra cui antinfiammatori, beta-bloccanti, simpatomimetici, antiepilettici, composti neuroattivi, regolatori lipidici, antibiotici e molti altri sono stati riconosciuti nelle acque in uscita dai depuratori, in quelle fluviali, costiere ed anche nelle acque potabili di molti paesi (*Fent et al., 2006*). Spesso gli studi analitici si sono occupati della misurazione della concentrazione di tali molecole nelle acque in uscita dai depuratori e nell’ambiente acquatico ricevente. Questo allo scopo di ottenere informazioni circa l’entità della diluizione a cui sono soggetti i farmaci nelle acque in cui sversano gli effluenti depurati che può essere influenzata dall’efficienza del ricambio idrico e, nel caso di bacini chiusi, dalle variazioni stagionali del livello delle acque. La presenza dell’antiestrogeno tamoxifen ad esempio è stata riscontrata in un range compreso tra 146 e 369 ng/L in uno studio effettuato sugli effluenti degli impianti di depurazione del Regno Unito, mentre la sua concentrazione media registrata in ambienti estuarini è stata di 53 ng/L con valori massimi di 212 ng/L (*Roberts and Thomas, 2005*). Tali valori indicano la capacità da parte del farmaco di accumularsi in ambiente acquatico in cui a volte la sua concentrazione supera addirittura quella delle fonte di contaminazione.

I farmaci appartenenti alla famiglia degli analgesici ed antinfiammatori sono quelli maggiormente utilizzati dalla popolazione e pertanto le concentrazioni in ambiente raggiungono valori molto elevati. L’acido acetilsalicilico, principio attivo dell’Aspirina, ha raggiunto valori massimi pari a 59,6 µg/L nelle acque d’uscita dai depuratori con rischi elevatissimi per l’ecologia delle acque riceventi. Particolare attenzione meritano anche i

composti beta-bloccanti tra cui propranololo e metoprololo che sono stati osservati in ambiente acquatico a concentrazioni medie di 0,59 e 2,2 µg/L rispettivamente.

Tabella 1.2. Capacità di rimozione dei residui farmaceutici da parte degli impianti di depurazione (Fent et al., 2006)

COMPOSTO	INFLUENTI STP (µg/L)	EFFLUENTI STP (µg/L)	MASSIMA RIMOZIONE (%)
Propranololo	70	304	0
Gemfibrozil	[0.3]	[0.18–0.28]	16–46
Acido clofibrico	[1]	[0.68–0.88]	15–34
Carbamazepina	0.7	0.7	<50
Diazepam	0.59–1.18	0.1–0.66 93	93
Etinilestradiolo	0.003	0.0004	85
Acido acetilsalicilico	3.2	0.6	81
Diclofenac	3.0	2.5	17
Ibuprofene	38.7	4	>90
Ketoprofene	0.25–0.43	0.15–0.24	8–53
Naproxen	40.7	12.5	40–100

Altre classi farmaceutiche come quella degli antidepressivi sono solitamente apprezzate a concentrazioni minori in ambiente. Tuttavia la loro attività anche a bassissime dosi determina ingenti rischi per le popolazioni acquatiche, specie in funzione delle attività che regolano. Nelle acque di uscita dagli impianti di depurazione canadesi il tenore di Carbamazepina osservato è stato di 23 µg/L mentre il Diazepam, principio attivo del Valium è stato misurato a concentrazioni pari a 0,04 e 0,66 µg/L rispettivamente negli effluenti degli impianti di depurazione in Olanda e Belgio (Ternes, 1998; Metcalfe et al., 2003; Van der van et al., 2004). La Tabella 1.2 mostra le concentrazioni di alcuni farmaci nelle acque in entrata e in uscita dagli impianti di depurazione.

1.5. LINEE GUIDA PER LA VALUTAZIONE DI RISCHIO AMBIENTALE

All'inizio degli anni 90 l'aumento delle informazioni disponibili circa la presenza e la persistenza dei residui farmaceutici negli ecosistemi acquatici produssero le condizioni

necessarie per un intervento legislativo comunitario finalizzato al controllo e alla limitazione dei rischi ambientali di contaminazione. Nel 1993, attraverso la normativa 93/39/EEC veniva resa obbligatoria la segnalazione di ogni possibile rischio ambientale correlato all'utilizzo dei farmaci. Poco dopo l'Agencia Europea per la Valutazione dei Farmaci (EMA) introdusse il principio di valutazione di rischio ambientale (ERA) per tutti i nuovi farmaci brevettati come requisito fondamentale ad ottenere l'autorizzazione alla messa in commercio.

Nel 1997 furono pubblicate le prime linee guida per la valutazione di rischio ambientale dei farmaci per uso veterinario, mentre per i farmaci per uso umano si sono attese le linee guida del 2001, modificate nel 2003 e nel 2005.

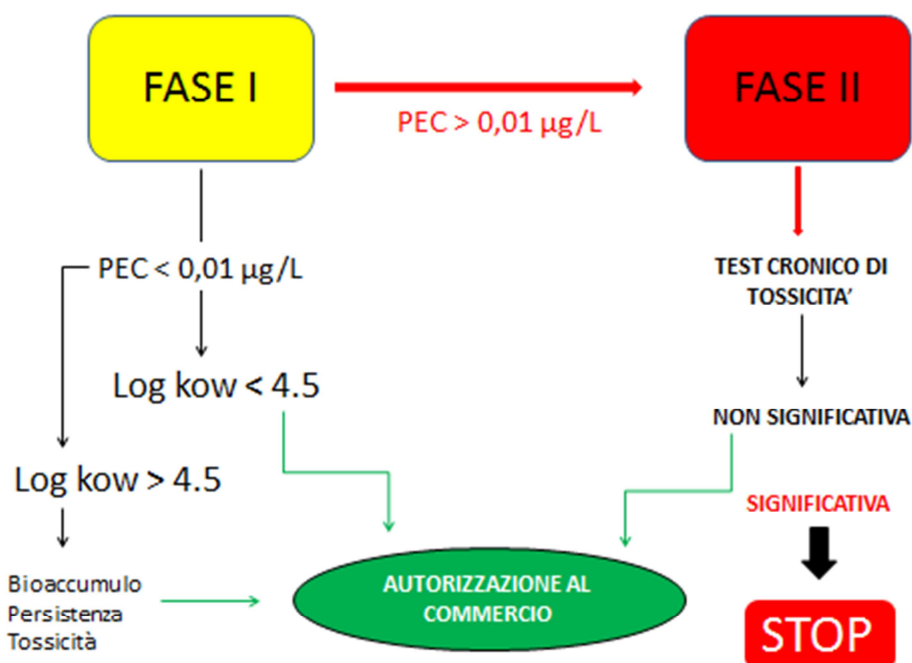


Figura 1.2. Linee guida EMA per la valutazione di rischio ambientale dovuto alla contaminazione di farmaci ad uso umano

L'1 Dicembre 2006 entrava dunque in vigore il testo definitivo, che descriveva i protocolli necessari alla valutazione di rischio ambientale richiesti dalla Commissione Europea.

La procedura è sostanzialmente divisa in due parti: la fase I prevede la stima del PEC (Predicted Environmental Concentration) ovvero la concentrazione prevista in ambiente per quel farmaco basata su considerazioni riguardo la natura chimica della molecola, i dosaggi a cui viene somministrata, la sua cinetica, il grado di diluizione previsto negli ecosistemi acquatici e l'incidenza nel mercato. Se il PEC risulta essere superiore a

0,01µg/L. le linee guida prevedono una fase II caratterizzata da test ecotossicologici, da svolgersi rigorosamente su particolari bioindicatori. secondo appositi protocolli definiti dall'OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) e dall'International Organization for Standardization (ISO).

A queste procedure si aggiungono le raccomandazioni della OSPAR (*Oslo and Paris commission*) sulle molecole farmaceutiche con Log K_{ow} maggiore di 4,5, per le quali sono ritenute necessarie prove di bioaccumulo, persistenza e tossicità. Uno schema riassuntivo dell'iter di approvazione dei farmaci destinati ad uso umano è riportato in Figura 1.2.

La stessa EMEA ha tuttavia avanzato alcune critiche alle sue prescrizioni. Diversi studi infatti dimostrano gli effetti di alcuni farmaci a concentrazioni ben più basse rispetto alla soglia di 0,01µg/L prevista dalle linee guida. Di tali composti, definiti altamente attivi, fanno parte soprattutto gli ormoni steroidei sintetici, come il 17- α - Ethinylestradiolo EE2 (estrogeno sintetico) e il 17-Methyltestosterone (androgeno sintetico), per i quali i dati mostrano valori di LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) inferiori a 10 ng/L e in alcuni casi ad 1 ng/L (*Fujioka, 2002; Jobling et al. 2003*). Ad essi si aggiungono alcuni fungicidi, regolarmente utilizzati negli impianti di acquacoltura anche a scopi preventivi. A tal proposito *Christen et al, 2010* forniscono una serie di raccomandazioni per il riconoscimento dei composti altamente attivi. Ciò che è stato proposto è di procedere al riconoscimento di tali sostanze attraverso un approccio iterativo articolato in 3 step:

1. Identificazione del meccanismo d'azione di un determinato composto. Ciò che andrebbe considerata è soprattutto la specificità o aspecificità di un farmaco a livello recettoriale. I dati a disposizione dimostrano che i farmaci ad azione specifica sono solitamente attivi anche se presenti in tracce mentre quelli ad azione aspecifica presentano effetti negli organismi non target a concentrazioni superiori a 0,01µg/L.
2. Valutazione del grado di omologia tra i recettori degli organismi target (e. uomo) e quelli degli organismi non target (ad es. molluschi). L'ipotesi, spesso confermata, è che la sensibilità delle specie non target all'azione del

farmaco aumenti in maniera proporzionata all'omologia con i recettori delle specie per cui il farmaco è brevettato.

3. Classificazione di tutte le funzioni biologiche alterate/regolate dall'azione del farmaco in tutti gli organismi potenzialmente esposti. Sono state riconosciute alcune funzioni biologiche in grado di subire importanti alterazioni anche a seguito dell'interazione con piccolissime dosi di farmaci, fra queste soprattutto accrescimento e riproduzione

La ricerca scientifica è dunque in grado di fornire alle autorità preposte le informazioni necessarie alla definizione di normative ed adeguati strumenti di gestione in materia di contaminazione ambientale da residui farmaceutici. Il riconoscimento di un composto altamente attivo rappresenta infatti un passo avanti rispetto agli studi precedenti, per lo più focalizzati sulla tossicità acuta dei farmaci nelle specie non target.

1.6. EFFETTI ECOTOSSICOLOGICI DEI FARMACI

Il modo con cui i farmaci svolgono la loro funzione terapeutica è sostituendosi a particolari molecole endogene nell'interazione con specifici recettori di membrana che hanno il compito di trasferire ai processi interni l'attivazione o l'inibizione di alcune funzionalità cellulari. A seconda della sua funzione il farmaco può fungere da antagonista o da agonista di un particolare recettore, regolandone l'attività. Quando introdotti in ambiente i farmaci possono agire su tutti gli esseri viventi organi, tanto più quando sono condivise caratteristiche tissutali, cellulari o molecolari. Per esempio alcuni recettori degli invertebrati sono simili a quelli umani, altri invece sono differenti, o addirittura assenti. Questo può portare ad un meccanismo d'azione del farmaco con effetti differenti, o inattesi (*Fent et al., 2006*).

Per i test acuti la direttiva europea 93/67/EEC definisce tra le caratteristiche fondamentali affinché un farmaco non rappresenti un rischio per gli ecosistemi un $EC_{50} < 100$ mg/L, concentrazione di gran lunga superiore a quella misurata in ambiente

Tra i farmaci β -bloccanti il propranololo è senza dubbio quello i cui effetti ecotossicologici sono stati meglio riconosciuti e studiati. In *Daphnia magna* i risultati di uno studio descrivono valori di EC_{50} pari a 1,6 mg/L dopo 48 ore di esposizione, mentre valori molto più bassi sono stati registrati nel fitoplancton (Huggett et al., 2002, Ferrari et al., 2004).

Il diclofenac, analgesico appartenente alla categoria dei FANS (antinfiammatori di origine non steroidea), è stato oggetto di test su diversi organismi acquatici. La tossicità nel fitoplancton rivela un valore minimo di EC_{50} di 14,5 mg/L dopo 96 ore di esposizione, mentre in alcuni invertebrati le dosi necessarie a stimare lo stesso parametro sono di circa 22,43 mg/L (Webb, 2001, Cleuvers, 2003). In *Daphnia magna* la carbamazepina, antiepilettico, è in grado di determinare EC_{50} pari a 17,2 mg/L mentre l'inibizione della crescita può essere registrata già a concentrazioni di 12,7 mg/L (Thaker, 2005).

Gran parte degli studi citati riguardano la valutazione degli effetti acuti di diverse molecole farmaceutiche sulla biologia di specie tipicamente usate per test di laboratorio (es. *Daphnia magna*). Essi rivelano che le concentrazioni a cui si osservano effetti significativi sulla fisiologia degli organismi acquatici sono ben più alte di quelle riscontrate in ambiente, in cui, pertanto, il rischio che si verificano alterazioni significative, a fronte di questi test venne definito molto basso (Webb, 2001; Cleuvers, 2003; Fent, 2003, Fent et al., 2006).

Tuttavia occorre tener presente che gli organismi che colonizzano le acque superficiali, specie quelle marino-costiere, subiscono spesso l'esposizione ai farmaci per tutta la durata del loro ciclo vitale. Sulla base di ciò appare indispensabile analizzare gli effetti cronici dei composti farmaceutici al fine di un'adeguata valutazione di rischio ambientale. Uno studio effettuato da Länge e coll. (2001), ha analizzato gli effetti a lungo termine dell'17- α -etinilestradiolo, ormone sintetico contraccettivo attivo anche a bassissime concentrazioni nell'uomo, sulla riproduzione e sulla sex ratio del ciprinide *Pimephales promelas*. I risultati dimostrarono che, seppur a concentrazioni inferiori a 5 ng/L, lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari era inibito nei maschi e il rapporto fra i sessi veniva alterato significativamente in favore delle femmine. Un recente studio effettuato presso il nostro laboratorio ha riconosciuto una significativa alterazione dei livelli di AMP-ciclico nei tessuti di *Mytilus galloprovincialis* sottoposti per 7 gg a concentrazioni pari a 0,3 – 3 ng/L di Propranololo, β -bloccante di comune utilizzo farmaceutico (Franzellitti et al., 2011).

Recentemente si sono approfonditi gli studi finalizzati ad analizzare la concentrazione dei farmaci nei tessuti di organismi non target, aprendo la strada ad approfondimenti futuri circa un fenomeno, quello del bioaccumulo dei residui terapeutici, ad oggi ancora poco considerato nella valutazione di rischio ambientale. In *Carassius auratus* dopo 14 giorni di esposizione al regolatore lipidico Gemfibrozil, la concentrazione plasmatica del farmaco è stata riscontrata a valori fino a 500 volte superiori rispetto a quella di esposizione (Brown *et al.* 2007). Uno dei parametri utilizzati ai fini analitici è il Fattore di Bioconcentrazione (BCF) determinato dal rapporto tra la concentrazione di farmaco nei tessuti e quella dell'ambiente circostante (Chiou, 2002; Daughton e Brooks, 2011).

In linea con quanto poi osservato da Christen *et al.* (2011), alcuni dei progetti di ricerca portati avanti dal laboratorio di fisiologia e biochimica ambientale del Centro Interdisciplinare di Ricerca per le Scienze Ambientali (CIRSA) si sono occupati di analizzare le risposte a livello della trasduzione del segnale AMPc-dipendente in *Mytilus galloprovincialis* a seguito dell'esposizione a composti neuroattivi in grado di interferire con tale via di comunicazione (Martin-Diaz *et al.*, 2009; Franzellitti *et al.*, 2011). In questo lavoro di tesi sono stati analizzati gli stessi pattern in mitili sottoposti ad un ampio range di concentrazioni di fluoxetina, antidepressivo utilizzato nella formulazione di alcuni composti farmaceutici dal consumo molto diffuso tra cui il Prozac e il Sarafem.

1.7. LA FLUOXETINA

2.7.1. CONCENTRAZIONI DI FLUOXETINA NEI COMPARTI IDRICI

La fluoxetina (FX) è un composto farmaceutico neuroattivo appartenente alla classe degli SSRI (Inibitori Selettivi della Ricaptazione neuronale della Serotonina) introdotto in commercio circa 20 anni fa da *Ely Lilly and Company* con la formulazione del Prozac, uno tra i più comuni farmaci antidepressivi in commercio. Strutturalmente la FX si presenta come una monoammina a due anelli aromatici contenente un gruppo alogeno rappresentato da 3 atomi di fluoro (Figura 1.3).

Si tratta di un principio attivo frequentemente prescritto per la cura delle patologie depressive, ossessivo-compulsive e della bulimia nervosa (Brooks *et al.*, 2003). Recentemente se ne è proposto l'utilizzo in campo oculistico come cura della ambliopia data la sua particolare capacità di sviluppare la plasticità della corteccia visiva lesionata (Maya *et al.*, 2008). Il crescente interesse della comunità scientifica sulla tossicità della FX non va considerato come conseguenza di un aumento dei consumi, ma piuttosto in relazione alla durata delle terapie in cui è impiegata che ne prevede un utilizzo giornaliero per una durata complessiva compresa tra 1 e 22 mesi (Kreke e Dietrich, 2008).

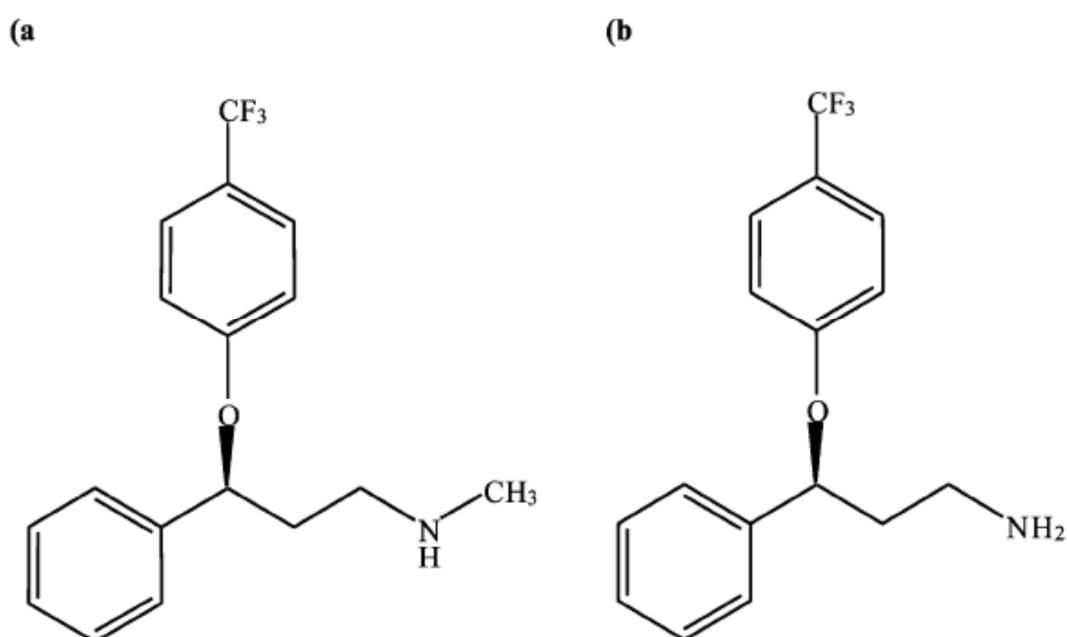


Figura 1.3. Struttura chimica della fluoxetina (a) e del suo metabolita norfluoxetina (b) (Brooks *et al.*, 2003)

Diverse indagini hanno dimostrato la resistenza da parte della fluoxetina ai convenzionali processi di depurazione delle acque reflue (Kolpin *et al.*, 2002; Metcalfe *et al.*, 2003, 2011; Vanderford e Snyder, 2006; Fent *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2006). Alcuni autori descrivono un discreto profilo di adsorbimento della FX a materia organica disciolta e sedimenti con valori di Log K_{oc} (coefficiente di assorbimento) pari a 4.72 e 4.87 rispettivamente, e concentrazioni medie nei sedimenti e nei fanghi di depurazione di 1,8 ng/L (Furlong *et al.*, 2003; Yamamoto *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2008). Ad ogni modo i dati a disposizione ci consentono di affermare che circa il 10% della fluoxetina assunta viene rilasciata in ambiente, dove è resistente ai naturali processi di idrolisi e fotolisi (Van Harten, 1993). Le

concentrazioni misurate variano da un massimo di 12 ng/L per le acque superficiali sino a 540 ng/L per le acque di scarico depurate (Kolpin *et al.*, 2002; Weston *et al.*, 2001).

I rischi ambientali legati alla presenza di FX negli ecosistemi acquatici riguardano soprattutto le proprietà chimiche, fisiche e farmacologiche della molecola. Una volta assorbita la FX subisce reazioni di demetilazione ad opera del citocromo P-450 il quale catalizza una reazione di conversione della fluoxetina in norfluoxetina (NFX), metabolita altamente attivo, di difficile riconoscimento in fase rispetto alla molecola non metabolizzata (Kolpin *et al.*, 2002). Van Harten, (1993), ha quantificato l'ammontare della NFX escreta in circa il 7% del totale prodotto e successive analisi hanno dimostrato una concentrazione pari a 9.9 ng/L nelle acque di scarico dirette agli STP (Vanderford e Snyder 2006). Per una corretta valutazione di rischio ambientale occorre dunque che la concentrazione di fluoxetina non assorbita dall'organismo sia sommata a quella dei metaboliti attivi, i quali a loro volta potrebbero formarsi negli organismi acquatici ove esistessero simili vie metaboliche, ed escreti nell'ambiente circostante.

1.7.2. BIOACCUMULO DI FLUOXETINA NEI TESSUTI DEGLI ORGANISMI ACQUATICI

La FX ha una biodisponibilità molto alta. Circa il 90% della dose ingerita viene assorbita a livello epatico con un volume di distribuzione compreso tra 14 e 100 L/Kg, rappresentante un altissimo potenziale di accumulo tissutale (Van Harten, 1993; Catterson e Preskorn, 1996; Hiemke e Hartter, 2000). In ragione di ciò, recenti studi sulla diffusione di FX e NFX nei tessuti di organismi acquatici hanno dimostrato una significativa relazione tra il bioaccumulo dei composti e alcune caratteristiche chimico-fisiche del mezzo acquoso in cui sono disciolte. Per esempio a pH neutro la lipofilità di FX e NFX, espressa in Log K_{ow} misura rispettivamente valori di 1.57 e 2.05 a cui corrispondono una bioconcentrazione (BCF, *bioconcentration factor*) nei tessuti di teleosteo pari a 2 e 6.97. Al contrario, in condizioni alcaline (pH 11) si nota un aumento significativo della lipofilità della molecola con valori di BCF di 1071.52 e 716.12 per FX e NFX (Brooks *et al.*, 2003). La bioconcentrazione di FX aumenta in maniera proporzionata al pH in quanto in ambiente alcalino essa è presente nella forma non ionizzata, il cui trasporto all'interno dei tessuti avviene per lo più per diffusione facilitata. In Tabella 1.3 è possibile osservare

numericamente tale influenza del pH sulla lipofilicità della molecola, ed il relativo aumento del Log Kow in condizioni alcaline.

Recenti studi hanno inoltre dimostrato che l'accumulo di NFX risulta in molti casi maggiore di quello di FX, a causa della minore polarità del metabolita (*Daughton e Brooks, 2011*). Uno studio intrapreso da *Paterson e Metcalfe (2008)* si è occupato di analizzare assorbimento, bioaccumulo ed eliminazione di FX in individui appartenenti alla specie *Oryzias latipes* (Medaka) sottoposti per 7 giorni a concentrazioni di fluoxetina di 0,55 µg/L. Dopo 6 giorni la concentrazione di NFX superò quella di FX nei tessuti degli individui esposti con valori pari a 64 µg/kg contro i 40 misurati per la FX. Nei teleostei le più alte concentrazioni tissutali sono state ritrovate nel cervello con medie di BCF pari a 1.58 per la FX e 8.86 per la NFX (*Brooks et al., 2005*). In media la bioconcentrazione nei tessuti di pesce, sia in quelli di laboratorio che in quelli selvatici catturati varia tra 74 e 80 per la FX e 117 per la NFX (*Brooks et al., 2005; Paterson e Metcalfe, 2008*). Tali risultati oltre a quanto detto sinora sono il risultato della maggior persistenza nei tessuti da parte della NFX, che in alcuni casi raggiunge i 15 giorni di emivita, rispetto agli 1-4 del composto non demetilato (*Hiemke e Hartter, 2000*).

Tabella 1.3 Alcuni dei parametri fisico-chimici di FX e NFX e relative variazioni di BCF, Log Kow e Log Koc in funzione del pH (*Brooks et al., 2003*)

Parameter	Fluoxetine			Norfluoxetine		
	pH			pH		
<i>Physiochemical parameter</i>						
Empirical formula	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO			C ₁₆ H ₁₆ F ₃ NO		
Molecular weight	309.33			295.3		
PK _a	10.06 ± 0.10			9.05 ± 0.13		
<i>Environmental fate parameter</i>						
log K _{ow}	2.0	7.0	11.0	2.0	7.0	11.0
BCF	~1	2.00	1071.52	~1	6.97	716.12
log K _{oc}	0.64	0.97	3.70	0.49	1.57	3.58

BCF = Fattore di bioconcentrazione

Log Kow = coefficiente di ripartizione ottanolo /acqua

Log Koc = coefficiente di ripartizione carbonio (suolo) /acqua

1.7.3. MECCANISMO D'AZIONE DELLA FLUOXETINA

Dal punto di vista farmacologico la FX è dotata di un meccanismo d'azione plurifocale a livello delle sinapsi serotoninergiche. Determinando il blocco del trasportatore di

membrana (SERT) posto a livello presinaptico, deputato al riassorbimento selettivo della serotonina, cui consegue una maggiore permanenza del neurotrasmettitore a livello delle fessure sinaptiche (Ghoneim *et al.*, 2011) (Figura 1.4). Inoltre l'inibizione della funzionalità del SERT facilita il rilascio neuronale del neurotrasmettitore e ne aumenta la disponibilità in prossimità delle fessure sinaptiche.

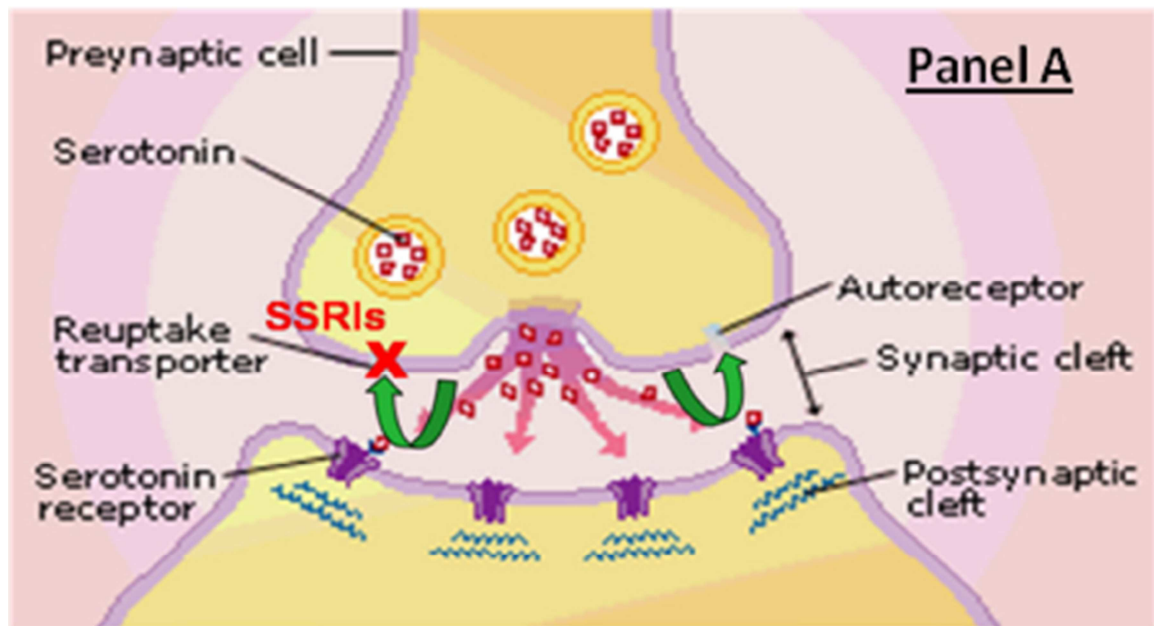


Figura 1.4. Meccanismo d'azione degli inibitori selettivi del riassorbimento neuronale di 5HT (Ghoneim *et al.*, 2011)

Il principale effetto di tale meccanismo d'azione è dunque quello di prolungare l'azione del neurotrasmettitore regolando di conseguenza tutti i processi biologici modulati dal sistema nervoso serotoninergico.

1.7.4. PROCESSI BIOLOGICI REGOLATI DAL SISTEMA NERVOSO SEROTONINERGICO

Dal punto di vista evolutivo, la serotonina (5HT) è uno dei neurotrasmettitori più antichi e meglio conservati (Hay-Schmidt, 2000). Il sistema serotoninergico è stato riconosciuto e studiato in quasi tutti i phyla, in cui è implicato nella regolazione di una moltitudine di aspetti biologici nonché nell'eziologia di numerosi stati patologici (Hoyer *et al.*, 2001). Nei mammiferi svolge un'azione specifica sulla modulazione del tono dell'umore, del

comportamento aggressivo e sull'espressività degli stati emozionali. E' inoltre coinvolta nello sviluppo dei caratteri sessuali secondari, regolando di conseguenza il comportamento sessuale e la gametogenesi. Negli organismi acquatici coordina importanti aspetti del processo riproduttivo, tra cui la maturazione delle gonadi e il rilascio di gameti (Brooks et al., 2003, 2005) . Svolge un ruolo chiave nella regolazione dei ritmi biologici circadiani e nelle risposte a fattori di stress fisiologico e coordina dal punto di vista comportamentale le manifestazioni aggressive e territoriali in diversi phyla (Fong et al., 1993, 1994; Menningen et al., 2011).

1.7.5. EFFETTI ECOTOSSICOLOGICI DELLA FLUOXETINA

Negli ultimi anni gli studi riguardanti gli effetti che la FX esercita sulla fisiologia degli organismi acquatici sono stati approfonditi al fine di valutare gli impatti ecotossicologici del composto sugli ecosistemi maggiormente esposti.

Alla luce delle maggiori conoscenze riguardo le dinamiche fisiologiche che ne regolano i processi vitali, i pesci sono senza dubbio gli organismi oggetto di studio più frequenti e sui quali si sono potute osservare le risposte più importanti, spesso poi confermate anche in phyla differenti.

Nel pesce rosso (*Carassius auratus*) l'iniezione del farmaco per 2 settimane determina un abbassamento significativo dei livelli plasmatici di estradiolo nelle femmine e ad un innalzamento dei livelli basali dello stesso nei maschi sessualmente maturi, in cui si può inoltre osservare una riduzione di circa il 75% dei livelli di testosterone associata ad una riduzione dello sviluppo del gonopodio (Menningen et al., 2008). Al contrario in individui di sesso femminile appartenenti alla specie *Oryzas latipes* esposti a concentrazioni di 100 ng/L di FX si apprezza un aumento significativo della concentrazione di estradiolo plasmatico (Foran et al., 2004). L'alterazione dei processi fisiologici dell'asse riproduttivo da parte della FX sembra inoltre essere determinata dagli effetti di quest'ultima sulla sintesi di isotocina e dopamina, entrambi ormoni peptidici coinvolti nei processi di maturazione delle gonadi, gametogenesi e vitellogenesi (Koch et al., 2002; Menningen et al., 2008). Importanti alterazioni sono note anche sul comportamento dei pesci, in particolare sui processi che regolano l'aggressività di alcune specie. Nel pesce combattente *Betta splendens* l'esposizione al farmaco determina una diminuzione dell'aggressività territoriale (Lynn et al., 2007), mentre in *Danio rerio* (Zebrafish) si

osserva una significativa riduzione della locomozione e della motilità larvale (Egan *et al.*, 2009). I livelli plasmatici di cortisolo, ormone steroideo coinvolto nella risposta a diversi fattori di stress, risultano particolarmente alterati dall'esposizione al farmaco, che ne provoca un sostanziale aumento in *Onchorynchus mykiss* e una significativa diminuzione in Zebrafish (Egan *et al.*, 2009; Menningen *et al.*, 2011).

Riguardo agli invertebrati acquatici, gli effetti della FX sono stati investigati soltanto di recente. Le ragioni di ciò sono più che altro dovute alle scarse conoscenze riguardanti i pattern endocrinologici dei diversi phyla, per cui in molti casi il sistema serotonergico, pur essendo noto, non è stato ancora completamente caratterizzato.

Nei crostacei sono stati individuati effetti specie specifici che riguardano diversi processi biologici. In *Daphnia magna* e *Ceratodaphnia dubia* è stata documentata una significativa riduzione dell'output riproduttivo e delle dimensioni della progenie proporzionata alla concentrazione di FX disciolta (Henry *et al.*, 2004; Pèrya *et al.*, 2008). Al contrario nel granchio violinista (*Uca pugilator*), la somministrazione determina la stimolazione dello sviluppo ovarico e testicolare e la dispersione dei cromatofori nel tegumento (Hanumante e Fingerman, 1984; Kulkarni e Fingerman., 1992a; Sarojini *et al.*, 1993). Nel gamberetto *Procambarus clarkii*, oltre a favorire lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari la FX determina un feedback negativo sui processi che regolano l'aggressività e il comportamento territoriale (Kulkarni e Fingerman 1992b, Panksepp *et al.*, 2003), fenomeno osservato anche in altri phyla, come nei labridi appartenenti alla specie *Thalassoma bifasciatum* (Perrault *et al.*, 2003).

Nei molluschi il sistema serotonergico svolge un'ampia gamma di funzioni biologiche. Di conseguenza gli effetti degli SSRI sul comportamento e sulla fisiologia di tali organismi sono molteplici. Principalmente gli effetti osservati riguardano la stimolazione di alcuni processi riproduttivi, tra cui maturazione delle gonadi ed emissione gametica (Fong *et al.*, 1998; Honkoop *et al.*, 1999; Gust *et al.*, 2009). Rispetto ad altri invertebrati, tuttavia, gli effetti sopracitati si verificano a dosaggi di gran lunga minori. Ne è un esempio *Dreissena polymorpha* (Zebra mussel) in cui lo spawning è indotto nei maschi in maniera significativa a concentrazioni di FX pari a 5×10^{-8} M (Fong, 1998). Al contrario nel gasteropode *Potamopyrgus antipodarum* la FX ha un effetto inibitorio sulla riproduzione,

mentre in altri organismi appartenenti alla stessa classe è in grado di agire da antagonista nei processi cellulari che regolano le rotazioni ciliari embrionali e/o la metamorfosi da stadio larvale a giovanile (*Couper e Leise.*, 1996; *Uhler et al.*, 2000). Bisogna oltretutto considerare che nei bivalvi il sistema nervoso serotoninergico è direttamente coinvolto nei meccanismi di attivazione, mantenimento e rilascio dei muscoli che regolano lo stato di “catch” (apertura e chiusura delle valve) oltre che nei processi di filtrazione e respirazione a livello delle ciglia delle lamelle branchiali, attività biologiche che sono pertanto potenzialmente compromessi dagli effetti della FX (*Kohler e Lindl*, 1980; *Sanderson et al.*, 1985).

1.8. LE TAPPE FONDAMENTALI DELLA COMUNICAZIONE CHIMICA

Gli organismi viventi regolano le loro attività biologiche attraverso un efficiente rete di comunicazione cellulare modulata da particolari molecole segnale (ormoni, neuro-ormoni e neurotrasmettitori) in grado di indurre risposte cellulari di lunga o breve durata anche in tessuti relativamente distanti dalla zona di rilascio (*Brooker R.J.* Biologia generale). Fatta eccezione per gli ormoni steroidei la maggior parte delle molecole segnale ha una natura idrosolubile che le rende incapaci di attraversare per diffusione la membrana cellulare e trasferire il segnale chimico all'interno della cellula. In ragione di ciò esse necessitano di interagire con dei recettori di membrana, di natura proteica, dotati di un dominio extracellulare di captazione del segnale e una porzione intracellulare attraverso cui trasferiscono l'impulso a specifici complessi enzimatici, che determinano la trasduzione del segnale attraverso una serie di reazioni chimiche finalizzate alla regolazione delle funzioni cellulari modulate dalla molecola segnale.

Schematicamente la trasduzione del segnale chimico è rappresentata da tre tappe fondamentali:

1. *Interazione ligando-recettore*: La molecola segnale si lega in maniera selettiva ad un recettore provocandone una transizione conformazionale che ne attiva la funzionalità. I ligandi idrofilici interagiscono con recettori di membrana, mentre le molecole segnale idrofobe (ormoni steroidei) si legano a proteine bersaglio citoplasmatiche o nucleari.

2. *Via di trasduzione del segnale:* In seguito all'associazione con le molecole segnale, i recettori innescano meccanismi di trasduzione intracellulari. Il processo è a carico di proteine ed enzimi che operano in successione fino a trasferire il segnale chimico ad una proteina bersaglio direttamente coinvolta nella modulazione in uno specifico processo cellulare.

3. *Risposta cellulare:* Le cellule rispondono all'impulso chimico in diversi modi, per esempio stimolando o inibendo la trascrizione genica, regolando la permeabilità di membrana attraverso l'apertura o la chiusura di canali ionici o mediante altre attività metaboliche. (*De Leo e Ginelli.*, Biologia e Genetica)

1.9. IL SISTEMA NERVOSO SEROTONINERGICO

1.9.1. IL RUOLO DEI RECETTORI SEROTONINERGICI NELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE NERVOSO

L'evoluzione del sistema nervoso serotoninergico ha seguito di pari passo quella degli organismi viventi assumendo un ruolo fondamentale nella regolazione di numerosi processi vitali. I recettori della serotonina apparvero circa 800 milioni di anni fa in organismi unicellulari eucarioti come i parameci (*Hannon et Hoyer*, 2008).

La serotonina deriva dal 5-idrossitriptofano, intermedio della biosintesi del triptofano, amminoacido essenziale comunemente assunto con la dieta. Viene sintetizzata principalmente nei neuroni serotoninergici del sistema nervoso centrale e periferico (SNC/SNP), ma è prodotta in minor quantità, anche in diversi tessuti non neuronali come quello cardiovascolare e gastrointestinale (*Hoyer et al.*, 2002). Il trasferimento del segnale serotoninergico all'interno delle cellule bersaglio avviene attraverso un'ampia varietà di recettori di membrana che a loro volta innescano una serie di reazioni chimiche in grado di regolare importanti processi biologici.

Gli studi riguardanti la classificazione del corredo recettoriale serotoninergico iniziarono nel 1957, anno in cui *Gaddum e Picarelli* distinsero, attraverso l'utilizzo di specifici ligandi, 2 differenti forme recettoriali per la serotonina, definite M e D in base al ligando a cui erano affini (rispettivamente Morfina e Dibenzilina). Nei decenni successivi la comunità scientifica è stata in grado di caratterizzare nei mammiferi 14 diverse forme

recettoriali dalla lunghezza variabile tra i 357 e i 504 amminoacidi. Grazie al perfezionamento delle tecniche di binding mediante radioligandi, all'avvento della biologia molecolare e agli studi fisiologici, i recettori sono stati suddivisi in 7 classi principali 5HT₁, 5HT₂, 5HT₃, 5HT₄, 5HT₅, 5HT₆ e 5HT₇, differenti per struttura chimica, sequenza amminoacidica, localizzazione tissutale e risposta fisiologica. (Hoyer *et al.*, 2002; Hannon *et Hoyer*, 2008).

Le classi 5HT₁, 5HT₂ e 5HT₄₋₇ fanno parte della superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR, G-protein coupled receptor). Il recettore 5HT₃ è invece un recettore ionotropico.

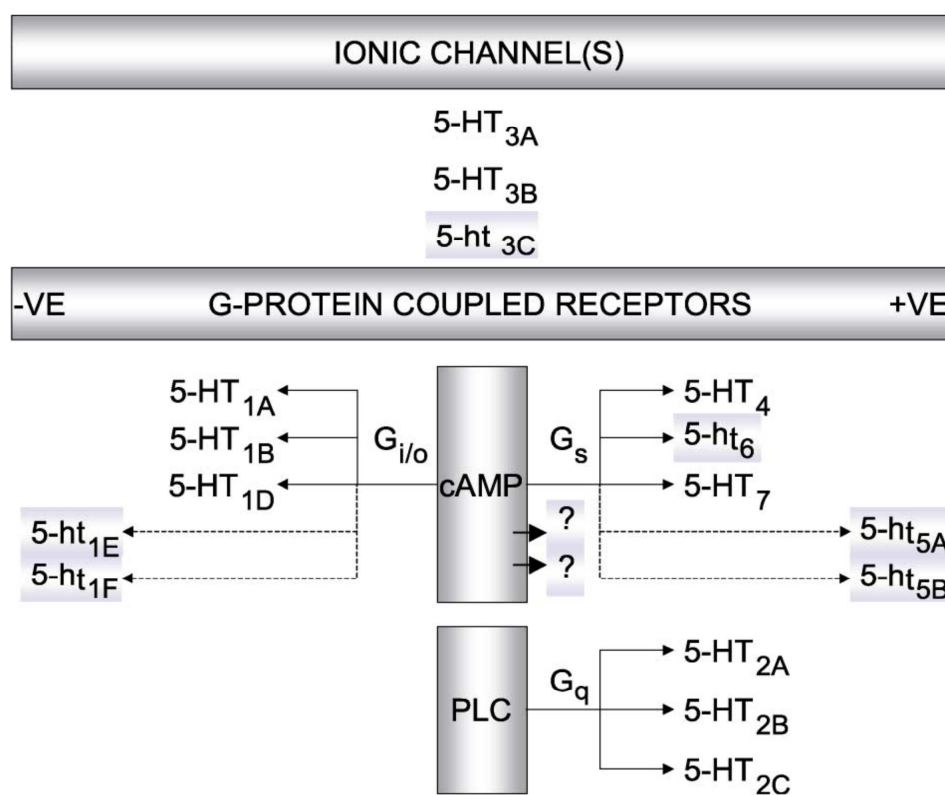


Figura 1.5. Rappresentazione grafica dell'attuale classificazione dei recettori 5-HT e dei rispettivi sottotipi recettoriali. Abbreviazioni: 3'-5' adenosina monofosfato ciclico (AMPc); fosfolipasi C (PLC), negativo (-ve), positivo (+ ve). (Hoyer *et al.*, 2002)

Dal punto di vista strutturale i GPCR sono definiti recettori “a serpentina” in quanto possiedono un dominio extracellulare N-terminale (NTD) seguito da sette α -eliche transmembrana (TM1-7), tenute insieme da 3 loop intracellulari (IL1-3) e tre extracellulari (EL1-3) e terminanti con un acido carbossilico intracellulare (CTD). La porzione N-terminale rappresenta il sito di riconoscimento per la serotonina.

Il ruolo svolto da tali recettori nella regolazione del segnale nervoso è strettamente collegato con la natura chimica della proteina G a cui sono accoppiati. La classe 5HT₁ presenta 5 sottotipi (A, B, D, E, F). Sono preferenzialmente accoppiati a proteine G_o e G_i, la cui attivazione inibisce la trasduzione del segnale AMPc-dipendente attraverso la riduzione dell'attività dell'enzima adenilil ciclasi (*Hoyer et al.*, 2002; *Hannon e Hoyer.*, 2008). Effetti inversi sono stati osservati nei roditori in cui alcuni sottotipi, in particolare il recettore 5HT_{1A}, stimola le cellule dell'ippocampo all'accumulo di AMPc (*Albert et al.*, 1999; *Markstein et al.*, 1999). Sempre per il recettore 5HT_{1A} è stata documentata l'attivazione di canali per il K⁺ regolati da proteine G e la stimolazione della via di trasduzione mediata da fosfolipasi C (PLC) che determina l'apertura dei canali del Ca⁺⁺, suggerendo una possibile interazione del recettoriale con la proteina G_q, deputata a tale ruolo (*Hannon and Hoyer*, 2008).

Nelle cellule neuronali i sottotipi 5HT_{1A}, 5HT_{1B} e 5HT_{1D} fungono anche da autorecettori presinaptici determinando un feedback negativo sulla sintesi di 5HT (*Price et al.*, 1996; *Roberts et al.*, 2001). L'attivazione dei recettori appartenenti alla classe 5HT₂ determina l'incremento della concentrazione citosolica e il rilascio extracellulare di Ca²⁺ tramite l'innescamento della via di trasduzione IP₃/PLC/Ca²⁺. I recettori 5HT₄, ₆ e ₇, al contrario di quanto visto per la classe 5HT₁, sono accoppiati a proteine G_s che mediano l'attivazione delle reazioni a catena che inducono la formazione di AMPc a partire da ATP. Pur essendo stati mappati e clonati attraverso sistemi ricombinanti, il ruolo fisiologico dei recettori 5HT₅ non è stato ancora definito, né è stato osservato alcun legame con i radioligandi convenzionalmente utilizzati per gli altri GPCR serotoninergici. Tuttavia *Carson et al.*, 1996, hanno fornito utili acquisizioni relative ad un'attività inibitoria del sottotipo ricombinante 5HT_{5A} nei confronti del segnale AMPc dipendente espresso negli astrociti di ratto, che tuttavia necessita di ulteriori conferme attraverso differenti approcci.

Per quanto concerne invece i recettori 5HT₃, unica classe non appartenente alla famiglia dei GPCR, essi sono costituiti da proteine a 5 domini transmembrana disposti a formare un canale la cui apertura è controllata da un ligando (la serotonina appunto). L'interazione con il recettore provoca una variazione conformazionale che permette l'apertura del canale ed

il conseguente flusso di ioni Na⁺ e K⁺ (Lummis, 2004; Popinako et al., 2011). Le funzioni recettoriali associate alle diverse classi sono schematizzate in Figura 1.5.

1.9.1.1. L'ESPRESSIONE DEI RECETTORI 5HT NEI MOLLUSCHI

Nei molluschi le conoscenze riguardo la tipizzazione, la classificazione e la localizzazione dei recettori serotoninergici ancora incomplete (Tierney, 2001). Ad oggi gli studi di fisiologia ambientale hanno permesso di identificare in *Lymnea stagnalis*. e *Aplysia californica* la presenza di due distinte tipologie recettoriali con caratteristiche funzionali e strutturali omologhe ai recettori 5HT₁ e 5HT₂ dei mammiferi (Sugamori et al., 1993; Gerhardt et al., 1996.; Li et al., 1995; Angers et al., 1998). Nella vongola *Sphaerium corneum* è stata invece riscontrata la presenza di recettori dal profilo fisiologico intermedio tra le due classi recettoriali. Tale profilo sembra essere comune nei bivalvi come dimostrato da diversi studi di induzione serotoninergica allo spawning effettuati su alcune specie rappresentative come *Ruditapes Philippinarum* e *Spisula solidissima* (Fong et al., 1996). Anche in *Dreissena polymorfa* (Zebra mussel) la struttura chimica dei recettori sembrerebbe essere omologa ai sottotipi 5HT_{1A} e 5HT_{1D}, ma gli studi farmacologici dimostrano in maniera significativa sia l'effetto inibitorio nei confronti dell'adenilil ciclasi che l'attivazione della fosfolipasi C, suggerendo per i recettori 5HT dei bivalvi un pattern evolutivo differente rispetto a quanto osservato nei mammiferi. (Fong et al., 2003).

Cubero-Leon e coll. (2010) hanno recentemente isolato e caratterizzato il gene codificante il recettore 5HT da individui di differente sesso e taglia di *Mytilus galloprovincialis*, il quale mostrerebbe un' elevata omologia di sequenza con i recettori 5HT₁ dei mammiferi. L'espressione genica non è risultata variabile in funzione del sesso ma differenze significative sono state osservate in relazione a taglia e sviluppo delle gonadi a conferma dell'importante ruolo svolto dal sistema serotoninergico nella riproduzione dei mitili, processo strettamente correlato con la taglia degli individui. Su queste basi gli effetti della 5HT nella trasduzione del segnale AMPc dipendente in *Mytilus galloprovincialis* appaiono di tipo inibitorio. Tuttavia le conoscenze a riguardo non permettono di confermare simili profili fisiologici che potrebbero essere oltremodo caratterizzati dalla presenza di differenti tipologie di recettori serotoninergici non ancora identificate nella specie.

1.10. LA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE AMP-CICLICO DIPENDENTE

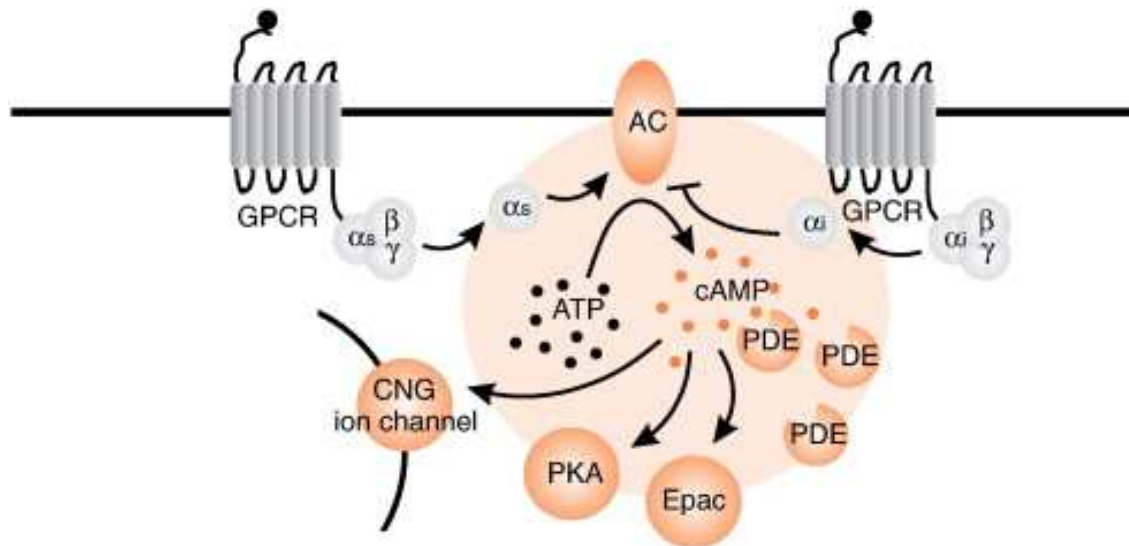


Figura 1.6. Illustrazione del pattern di trasduzione AMPc dipendente in cui sono raffigurati i principali complessi proteici: i recettori GPCR, l'Adenilil ciclasi (AC) e la protein chinasi A (PKA) (Mosenden e Taskèn, 2011)

Il 3',5' adenosina monofosfato ciclico (AMPc) viene definito in ambito fisiologico "Secondo messaggero" in quanto stimola l'attività di specifici enzimi, definiti regolatori interni, che modulano la risposta cellulare indotta da un determinato impulso di natura nervosa o ormonale che è quindi il "primo messaggero". Molti dei più importanti sistemi di comunicazione cellulare negli organismi viventi sono regolati attraverso questa via di trasduzione, che opera attraverso un complesso formato nel suo insieme da un recettore proteico transmembrana a sette α -eliche, una proteina G eterotrimerica, un enzima, l'adenilil ciclasi (AC) che catalizza la sintesi di AMPc e una chinasi citosolica detta protein chinasi A (PKA) che trasduce il segnale attraverso la fosforilazione di diversi substrati. La terminazione del segnale è invece regolata dall'enzima fosfodiesterasi (PDE), che idrolizza il legame fosfodiesterico 3',5' dell'AMPc con conseguente rottura dell'anello e linearizzazione della molecola (Figura 1.6). Tale sistema si è rivelato altamente conservato in quanto rappresentativo dei più importanti processi fisiologici di mammiferi, vertebrati non mammiferi ed invertebrati. In essi riveste un ruolo chiave in una vasta gamma di processi vitali tra cui oogenesi ed embriogenesi, sviluppo, secrezione ormonale, olfatto,

contrazioni cardiache, rilassamento della muscolatura liscia, metabolismo e altri meccanismi (*Fabbri e Capuzzo, 2010*). Ancora incertezze genera invece una sua possibile implicazione nella biochimica degli organismi vegetali, di cui ad oggi non si possiedono ancora dati significativi (*Gehring, 2010*).

Considerato il suo coinvolgimento in ambito terapeutico, le conoscenze relative alle dinamiche del segnale AMPc dipendente, sono state approfondite soprattutto per i mammiferi, mentre sono ad oggi poco note le risposte farmacologiche di tale sistema negli organismi appartenenti ad altre classi. Recentemente la comunità scientifica ha tuttavia intensificato gli studi sulle possibili alterazioni della via di trasduzione del segnale AMPc dipendente nei molluschi bivalvi come conseguenza di un loro crescente utilizzo come indicatori nelle valutazioni di impatto ambientale, nonché in relazione all'ormai storico interesse suscitato da tali organismi in ambito zootecnico. Per tali ragioni affiancare le già acquisite conoscenze sulle alterazioni di tali meccanismi fisiologici imputabili ad inquinanti convenzionali a nuove acquisizioni riguardo gli effetti di inquinanti emergenti contribuirebbe ad ottimizzare la visione d'insieme su un' argomento più che mai attuale quale la gestione sostenibile degli ecosistemi marino-costieri (*Fabbri e Capuzzo, 2010*).

1.10.1. LE PROTEINE G: STRUTTURA E FUNZIONI

Tra i recettori responsabili dell'attivazione della trasduzione del segnale AMPc dipendente quelli accoppiati a proteine G (*GPCR*) sono senza dubbio i più rappresentativi. Essi comprendono i recettori α e β -adrenergici (α e β -ADR), i recettori per il rilascio di corticotropine (CHRH), quelli per il glucagone (GcgR) e molti altri tra cui quello della serotonina ($5HT_R$) la cui struttura, comune a tutti i *GPCR*, è descritta nel paragrafo 2.9.1.

La formazione del complesso ligando-recettore permette la propagazione intracellulare del segnale chimico ad una proteina G situata sulla superficie interna della membrana citoplasmatica. Le proteine G sono così' denominate in quanto legano nucleotidi guanidinici come il GTP e il GDP. Il loro ruolo principale è quello di attivare o inibire l'attività di un'enzima, l'adenilil ciclasi, che catalizza la sintesi di AMPc. In forma inattiva le proteine G si presentano come eterotrimeri costituiti da una subunità α associata ad una molecola di GDP, e altre due subunità, β e γ di minor peso molecolare. L'attivazione della proteina G determina una variazione conformazionale che stimola lo scambio di GDP con

GTP a livello del sito di legame guanidinico della subunità α . Il trimero si dissocia in una porzione catalitica α -GTP e in un dimero $\beta\gamma$, il quale, a sua volta, si distanzia dalla superficie interna del recettore. In questa forma i due complessi sono entrambi in grado di interagire con le proteine bersaglio regolandone la sintesi a seconda del segnale (Figura 1.7).

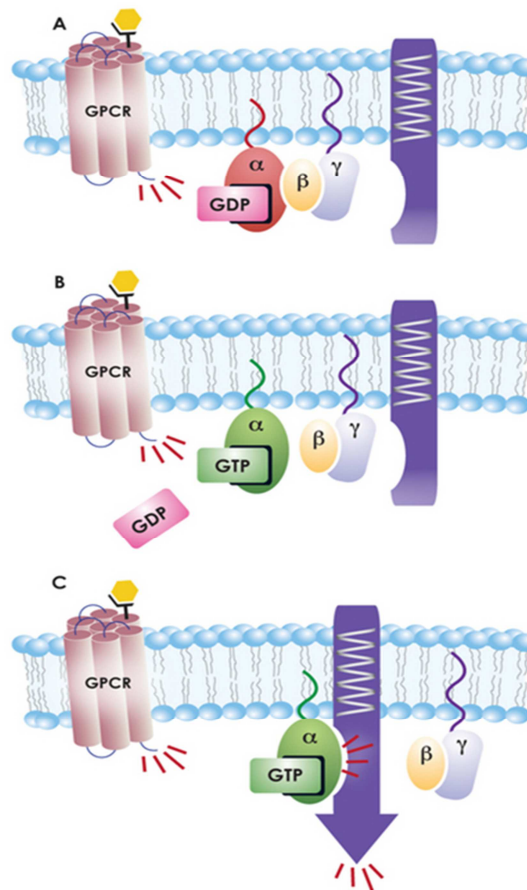


Figura 1.7 Meccanismo di attivazione e trasduzione del segnale AMPc dipendente ad opera della proteina G (fonte: www.caymanchem.com)

Nel caso dell'adenilil ciclasi, tuttavia, il complesso $\beta\gamma$ influenza positivamente o negativamente la sintesi dell'effettore a seconda della sua isoforma (Fabbri e Capuzzo, 2010).

La terminazione del segnale è gestita dall'attività GTP-asi della subunità α che permette l'idrolisi di GTP a GDP e la conseguente riassociazione con il dimero $\beta\gamma$.

La subunità α rappresenta la porzione meglio caratterizzata della proteina G ed è suddivisa in 4 classi in base ad omologie nelle sequenze aminoacidiche: G_s , G_i , G_q , G_{12} . G_s e G_i sono direttamente coinvolte nell'attivazione e nell'inibizione del segnale AMPc dipendente (Fabbri e Capuzzo, 2010), mentre G_q e G_{12} regolano rispettivamente l'attività della PLC e di proteine appartenenti al complesso delle GTP-binding protein.

1.10.2. L'ADENILIL CICLASI

Le proteine G regolano indirettamente la sintesi citosolica di AMPc attraverso l'attivazione dell'enzima Adenilil ciclasi (AC), appartenente alla classe delle liasi, in grado di idrolizzare una molecola di ATP in AMPc e pirofosfato. Si tratta di una proteina di membrana composta da un dominio N terminale, due domini transmembrana (M1 e M2) formato da 6 α -eliche, e due domini citosolici C1 e C2 che rappresentano la porzione catalitica dell'enzima (Tesmer e Sprang, 1998; Fabbri e Capuzzo, 2010) (Figura 1.8).

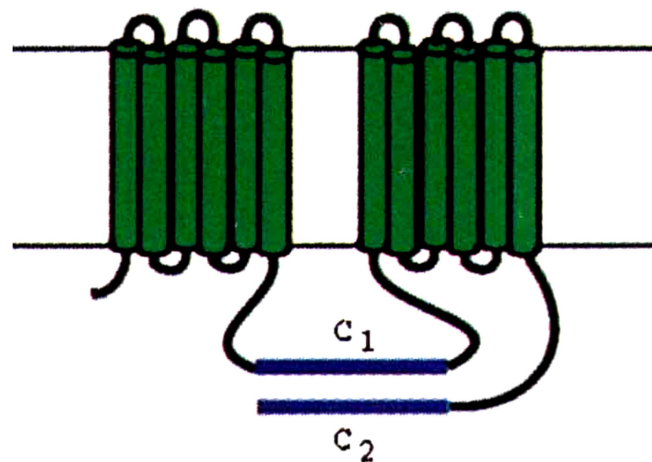


Figura 1.8 Rappresentazione di una molecola di AC in cui sono visibili i 2 domini transmembrana e le porzioni catalitiche C1 e C2 (Zhang et al., 1997)

Entrambi i domini citosolici comprendono due subdomini proteici Ca e Cb che eterodimerizzano a formare un unico dominio pseudosimmetrico. Su tale superficie sono localizzati 2 siti specifici, uno deputato all'interazione con le subunità α della proteina G, l'altra al legame con FSK (Forskolin), un diterpene a sua volta in grado di attivare l'enzima. L'interfaccia tra i domini C1 e C2 è considerata la chiave di regolazione della

molecola in quanto rappresenta un sito di legame per l'ATP in cui avviene la reazione di defosforilazione che permette la formazione di AMPc (Zhang *et al.*, 1997). L'azione dei suoi substrati, rappresentati da Fsk e $G_{\alpha s}$ determina un aumento di circa 10 volte dell'attività di defosforilazione, fenomeno ancor più accentuato dalla stimolazione sincrona da parte dei due effettori. Oltre che dall'azione di proteina G e FSK, l'attività dell'enzima sembrerebbe influenzata da una serie di molecole in grado di interagire con il pattern di trasduzione in maniera diretta o indiretta. Tra questi la protein chinasi C (PKC), la calmodulina, ioni calcio, residui $\beta\gamma$ e altri agonisti recettoriali (Fabbri e Capuzzo, 2010). In ragione di ciò nei mammiferi sono state sequenziate 9 isoforme dell'enzima raggruppate in varie sottoclassi a seconda delle molecole da cui sono regolate e della loro localizzazione tissutale (Linder and Schulz, 2003, Fabbri e Capuzzo, 2010). La tipologia di regolazione che tali molecole inducono nelle diverse isoforme dell'Adenilil ciclasi sono mostrate in Tabella 1.4.

Tabella 1.4. Proprietà regolatorie delle isoforme di Adenilil ciclasi nei mammiferi (Fabbri e Capuzzo, 2010)

AC isoform	$G_{\alpha s}$	$G\beta\gamma$	$G_{\alpha i}$	PKA	PKC	Ca^{2+}	FSK
AC I	+	-	-		+ (weak)	+Ca/CaM	+
AC II	+	+			+		+
AC III	+	-	-		+ (weak)	+Ca/CaM	+
AC IV	+	+			-		+
AC V	+	-	-	-	+	-free Ca^{2+}	+
AC VI	+	-	-	-		-free Ca^{2+}	+
AC VII	+	+			+		+
AC VIII	+	-				+Ca/CaM	+
AC IX	+	-			-	-Calcineurin	No effect
sAC	No effect		No effect			+free Ca^{2+}	No effect

1.10.3. LA PKA

Una volta sintetizzato l'AMPc attiva il suo substrato, la protein chinasi A (PKA) che rappresenta il diretto modulatore dei processi cellulari sotto il controllo del sistema di trasduzione del segnale AMPc-dipendente. In forma inattiva la PKA si presenta come un oloenzima tetramerico composto da due subunità regolatorie (Subunità R) a cui sono legate altrettante porzioni catalitiche (Subunità C). Ogni subunità R è formata da un dominio N-terminale e due siti di legame per l'AMPc. L'attivazione procede attraverso l'associazione

cooperativa di due molecole di AMPc a ciascuna delle subunità R, che comporta la dissociazione e la successiva attivazione delle rispettive subunità C (Figura 1.9). Una volta libere queste ultime determinano l'effetto enzimatico fosforilando una serie di substrati proteici citoplasmatici e/o nucleari (Trehwella, 2006; Bardales et al., 2008, Fabbri e Capuzzo, 2010).

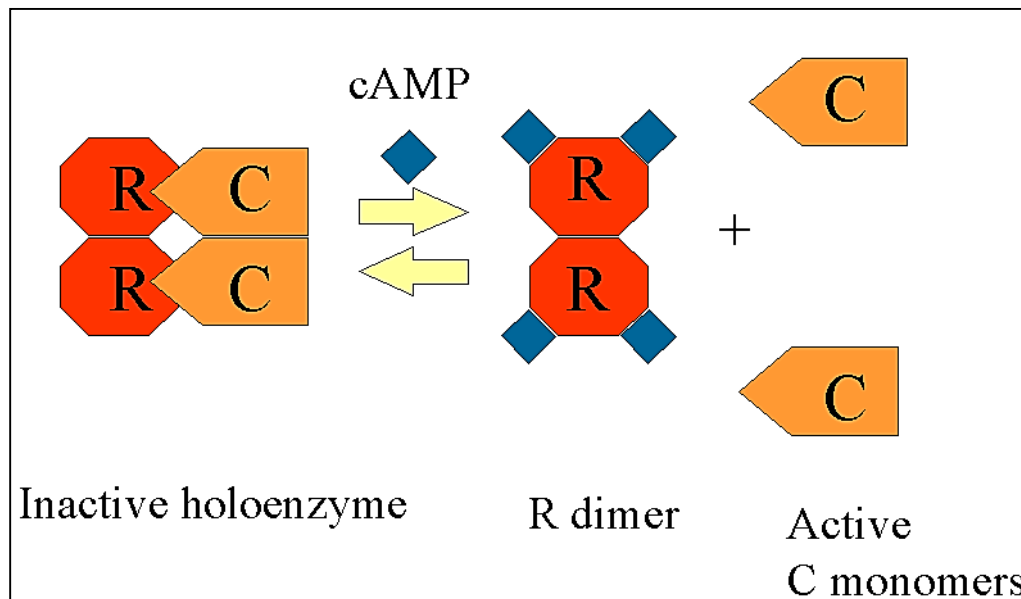


Figura 1.9 Meccanismo di attivazione della oloenzima PKA (Skalhegg e Taskèn, 1997)

Nei mammiferi sono presenti due particolari isoforme delle subunità regolatorie R, definite RI e RII. La differente distribuzione tissutale e le proprietà fisiche e biochimiche delle due isoforme ha permesso la classificazione delle enzima in PKA di tipo I e II. La prima, regolata dalla subunità RI, è localizzata prevalentemente nel citoplasma in forma libera, mentre la seconda tende a legarsi a substrati e organuli cellulari per mezzo di specifiche proteine denominate AKAP (A Kinase-Anchoring Proteins) che interagiscono in maniera diretta con le subunità regolatorie RII, fornendo all' enzima la capacità di regolare più efficientemente la fosforilazione dei substrati e di legare altri enzimi appartenenti alle classi delle chinasi e delle fosfatasi (Dodge-Kafka e Kapiloff, 2006).

1.11. LA TRASDUZIONE DEL SEGNALE AMPc DIPENDENTE NEI MOLLUSCHI BIVALVI

Il sistema di trasduzione AMPc dipendente regola una vasta gamma di funzioni fisiologiche nei molluschi bivalvi. In particolare, studi ormai datati ne confermano il coinvolgimento nella regolazione dell'asse riproduttivo inducendo la glicogenolisi durante il periodo di maturazione delle gonadi (*Bayne et al.*, 1982), il rilascio dei gameti (*Khotimchenko and Deridovich*, 1989) e la modulazione della steroidogenesi (*Fong et al.*, 1996). Analogamente è stato osservato che importanti processi di attivazione e rilascio della contrazione muscolare sono sotto il diretto controllo del sistema AMPc dipendente. Tra i più rappresentativi figurano la contrazione cardiaca (*Ono et al.*, 1992), il movimento di sifone e mantello (*Ram et al.*, 1999), l'attivazione del movimento delle ciglia laterali (*Sanderson et al.*, 1985) e il rilascio del muscolo adduttore durante la fase di catch (chiusura valvare) (*Yamada et al.*, 2001). I livelli intracellulari di AMPc sono inoltre coinvolti nella risposta ad una ampia gamma di fattori di origine naturale e antropica (*Lacoste et al.*, 2001a) e a tal proposito il nucleotide è stato individuato come potenziale biomarker per gli effetti fisiologici di inquinanti ambientali. Per analisi di questo genere, i mitili sono spesso scelti come organismi target in quanto ne sono relativamente ben caratterizzati i meccanismi fisiologici AMPc dipendenti (*Fabbri e Capuzzo*, 2010). In particolare una significativa attivazione dell'AC è indotta in *Mytilus galloprovincialis* dall'esposizione a metalli pesanti (*Fabbri e Capuzzo*, 2006) e inquinanti industriali da combustione, mentre una riduzione di AMPc è osservata a seguito dell'esposizione dei mitili ad alcuni farmaci quali la Carbamazepina (*Martin-Diaz et al.*, 2009) e il Propranololo (*Franzellitti et al.*, 2011). Ad ogni modo l'utilizzo dell'AMPc come biomarker di impatti ambientali appare poco consigliato in quanto le concentrazioni intracellulari della molecola sono regolate da una ampia varietà di modulatori endogeni ed esogeni e, come visto in precedenza, sono influenzate da alcuni processi stagionali, primi fra tutti la riproduzione (*Fabbri e Capuzzo*, 2010)

1.11.1. IL COMPLESSO DELL'ADENILIL CICLASI NEI MOLLUSCHI BIVALVI

Gran parte delle conoscenze riguardo la caratterizzazione dell'AC e delle proteine G nei molluschi bivalvi sono relative ad un numero ristretto di specie, le quali sono state evidenziate importanti differenze che aprono la strada ad approfondimenti futuri.

Per quanto riguarda la proteina G l'unico bivalve in cui sia stato sinora effettuato il sequenziamento delle subunità α e β è l'ostrica perlata *Pinctada fucata* in cui è risultato un elevato profilo di omologia con le rispettive subunità proteiche di altri molluschi tra cui il calamaro *Loligo pealei*. Quella clonata è una proteina G stimolatrice ampiamente espressa in branchie e mantello, meno abbondante nella ghiandola digestiva e assente nel muscolo (Chen *et al.*, 2004, 2005). In accordo con questi risultati, l'enzima espresso nel mantello e nel tessuto branchiale di *M. galloprovincialis* sembrerebbe regolato da proteine G_s con scarsa o assente affinità per il Fsk caratteristica discriminante dell'isoforma AC IX dei mammiferi. Al contrario il Fsk determina un aumento dell'attività dell'enzima nella ghiandola digestiva della stessa specie e nel tessuto gonadico di *Spisula solida*, suggerendo l'espressione di differenti isoforme dell'AC nei diversi tessuti dei bivalvi (Fabbri e Capuzzo, 2010).

Un evidente fenomeno di crosstalk è documentato nel bivalve duciaquicolo *Anodonta cigneae*, in cui la protein chinasi C, intermedio della trasduzione calcio-dipendente, attiva una proteina G_s o direttamente l'AC determinando il conseguente aumento della concentrazione citosolica di AMPc. (Pertseva *et al.*, 2003).

1.11.2. LA PKA NEI MOLLUSCHI BIVALVI

Nei molluschi bivalvi la protein chinasi AMPc-dipendente attiva una serie di substrati coinvolti nella regolazione di diversi processi fisiologici. Le attuali conoscenze riguardano soprattutto il ruolo svolto dall'enzima nella fisiologia di *M. galloprovincialis*. Diversi studi dimostrano variazioni stagionali dei livelli di PKA nel mantello come conseguenza dell'intensificazione dei fenomeni glicolitici e glicogenolitici, entrambi PKA dipendenti, durante la fase di maturazione delle gonadi (Sanjuan-Serrano *et al.*, 1995; Fernandez *et al.*, 1997; Bardales *et al.*, 2009). Oltre a ciò la PKA è coinvolta nella soppressione del metabolismo basale in risposta a fattori di stress e regola il rilascio della contrazione del muscolo adduttore posteriore (PAM) permettendo l'apertura valvare (Siegman *et al.*, 1998).

Con lo scopo di comprendere le dinamiche della regolazione PKA dipendente in *M. galloprovincialis* sono state isolate e caratterizzate 2 particolari isoforme della subunità regolatoria R (Diaz-Enrich *et al.*, 2003; Bardales *et al.*, 2007). Le due subunità,

denominate R_{myt1} e R_{myt2} , presentano entrambe massa molecolare di 54 kDa e una sequenza parziale omologa alle subunità RI e RII dei mammiferi. Tuttavia differiscono tra loro per proprietà biochimiche, chimico-fisiche e immunogeniche oltre che per distribuzione tissutale e intracellulare (Cao *et al.*, 1995 a,b; Rodriguez *et al.*, 1998; Bardales *et al.*, 2007; Bardales *et al.*, 2008). Le isoforme dell'enzima contenenti R_{myt1} o R_{myt2} , sono state purificate rispettivamente dal mantello e dal PAM e denominate PKA_{myt1} e PKA_{myt2} . Entrambe le isoforme sono attivate da AMPc e, con sensibilità 100 inferiore, da GMPc (Bardales *et al.*, 2004). Inoltre la PKA_{myt1} presenta una più elevata affinità di legame per i due nucleotidi, rispetto alla PKA_{myt2} che può essere spiegata dalla diversa localizzazione intracellulare delle due isoforme. Infatti la subunità R_{myt1} è un'isoforma citosolica, mentre R_{myt2} sembra essere associata ad organuli cellulari, attraverso l'interazione con le proteine di ancoraggio.

I due isozimi mostrano una certa complementarità a livello intracellulare e tissutale in quanto entrambi presenti in diversi tipi di cellule. Ad esempio nelle fibre muscolari del PAM, mentre la PKA_{myt1} appare distribuita uniformemente, la PKA_{myt2} occupa le zone periferiche delle fibre. Di conseguenza la PKA_{myt1} sembrerebbe l'isoforma maggiormente coinvolta nel rilassamento della muscolatura durante la fase di catch. La PKA_{myt1} è inoltre presente nel citoplasma delle cellule epiteliali dei palpi labiali, dell'intestino, e dei condotti digerenti, nelle cellule dei tubuli digestivi oltre che nelle cellule dei filamenti branchiali, mentre la PKA_{myt2} si trova principalmente nelle cellule apicali e periferiche del mantello, nelle ciglia delle lamelle branchiali e nel flagello degli spermatozoi (Bardales *et al.*, 2009).

Le due isoforme sembrano rispondere in maniera diversa alle variazioni stagionali di temperatura. Pur non essendoci relazioni significative relative all'affinità per l'AMPc in funzione della temperatura, l'attività della PKA_{myt2} risulta fino a 3,5 volte maggiore rispetto alla PKA_{myt1} a temperature superiori a 15°C. Questo assunto suggerisce il ruolo predominante della PKA_{myt2} nel controllo della gametogenesi processo attivato nei bivalvi durante la stagione primaverile in cui l'acqua raggiunge temperature relativamente più miti (Bardales *et al.*, 2004).

Un fenomeno interessante riguarda l'assenza delle due isoforme della PKA negli oociti immaturi seguita da una loro comparsa dopo il rilascio, lasciando presupporre la presenza di una regolazione tuttora indefinita che inibisce l'espressione della PKA fino alla completa maturazione degli oociti (*Bardales et al.*, 2009).

1.12. LA P-GLICOPROTEINA E LA MULTI XENOBIOTIC RESISTANCE NEI MOLLUSCHI BIVALVI

I molluschi bivalvi sono organismi continuamente esposti a sostanze tossiche di origine naturale o antropica. Per poter contrastare l'interazione di tali sostanze con i naturali processi cellulari essi sono dotati di una prima linea di difesa rappresentata dalla Multi Xenobiotic Resistance e di un secondo sistema di detossificazione che prevede l'utilizzo di enzimi in grado di trasformare i composti in molecole più facilmente estrudibili all'esterno della cellula.

La Multi Xenobiotic Resistance (MXR) è un efficiente meccanismo di detossificazione che prevede l'escrezione cellulare delle molecole potenzialmente tossiche attraverso l'attività di specifici trasportatori appartenenti alla famiglia degli ATP binding cassette (ABC) come la P-glicoproteina (Pgp) e la Multi Resistance Protein (MRP). Dal punto di vista biochimico la MXR presenta caratteristiche del tutto simili alla Multi Drug Resistance (MDR), fenomeno implicato nella resistenza ai chemioterapici da parte delle cellule tumorali (*Bard*, 2000).

La Pgp consiste in un dimero composto da 1280 aminoacidi localizzato a ridosso della membrana citoplasmatica. Dal punto di vista fisiologico è una proteina di trasporto, e il suo ruolo è quello di prevenire l'accumulo di sostanze tossiche di natura esogena e/o endogena, scongiurando in questo modo potenziali alterazioni del metabolismo cellulare. Le due parti di cui è composta sono rappresentate da 6 regioni transmembrana, un dominio citosolico e un sito di legame per l'ATP (*Chen et al.*, 1986). Il gene che codifica per le proteine della MXR in *Mytilus galloprovincialis* ha un'elevata omologia di sequenza con i rispettivi geni umani e di altri invertebrati marini come gli echinoidi. Questo assunto supporta l'ipotesi di un'elevata conservazione del meccanismo durante l'evoluzione delle specie (*Franzellitti e Fabbri*, 2006). Nei mammiferi l'espressione del gene ABCB1, codificante per Pgp, è

regolata da una trasduzione AMPc dipendente; nei bivalvi si è ipotizzato che la regolazione possa essere simile, pur senza evidenze dirette. Tuttavia recenti dati del laboratorio (*Franzellitti e Fabbri*, in corso di stampa) dimostrano come, almeno negli emociti dei mitili, l'espressione del gene codificante per Pgp sia effettivamente regolata dall'AMPc. Di conseguenza eventuali alterazioni nella trasduzione del segnale, imputabili a fattori esogeni e/o endogeni rischiano di alterare concretamente il metabolismo cellulare in seguito all'accumulo di xenobiotici. Nei mitili sono state osservate significative alterazioni dell'espressione dei geni associati alla MXR, tra cui il sopracitato ABCB1, in seguito all'esposizione a molecole farmaceutiche, metalli ed altri inquinanti organici (*Franzellitti e Fabbri*, 2006; *Martin-Diaz et al*, 2009; *Franzellitti et al.*, 2011).

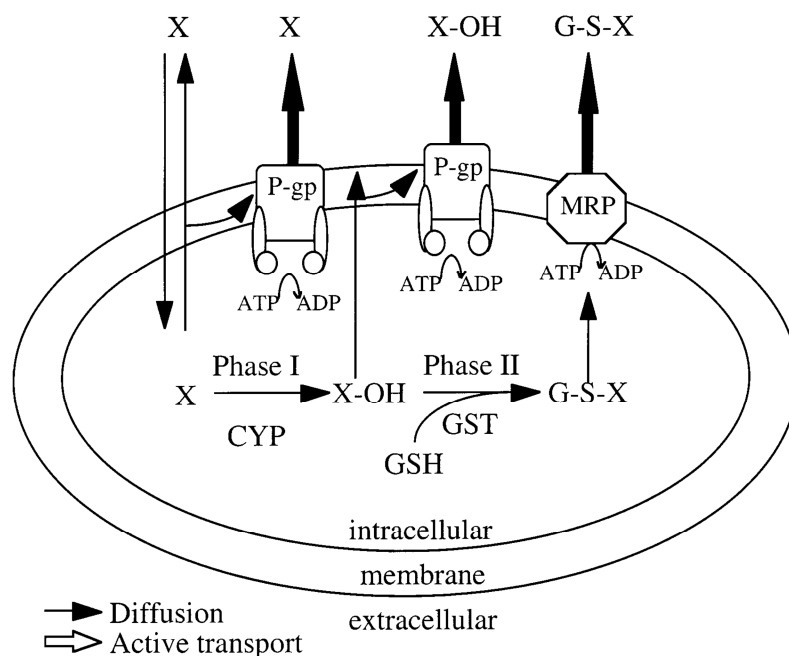


Figura 1.10 Modello speculativo della resistenza agli xenobiotici fornita da trasportatori attivi transmembrana, Pgp e MRP e da enzimi di detossificazione della I e II fase, il citocromo P450 (CYP) e il glutatione S trasferasi (GST), rispettivamente (*Bard*, 2000)

Ad oggi ci sono ancora scarsissime delucidazioni riguardo il meccanismo di trasporto della Pgp. La glicoproteina trasporta all'esterno della cellula un'ampia gamma di composti idrofobi. Pertanto i classici modelli di trasporto, funzionali all'eliminazione di sostanze idrofile, non sono sufficienti a spiegare tutti gli aspetti del trasporto mediato da Pgp. Alcune ipotesi fanno riferimento ad un trasporto attivo contro gradiente delle molecole

idrofobe, altri modelli ipotizzano un loro riconoscimento da parte della Pgp alla quale si legano per poi essere estruse direttamente attraverso la membrana fosfolipidica (*Bard, 2000*). Secondo *Sauna e Ambudkar (2000)*, il trasferimento di molecole da parte della Pgp richiede 2 molecole di ATP, utilizzate dalla proteina per il trasporto del substrato e per la ritorno allo stato conformazionale inattivo (Figura 1.10).

Diversi studi hanno dimostrato come in realtà la MXR possa essere stimolata nei mitili anche da fattori naturali, come le variazioni stagionali di temperatura (*Minier et al., 2000,2006; Tutundjian e Minier, 2007*), shock termici (*Eufemia e Epel, 2000*) e stati anossici (*Luedeking, e Koehler, 2004*). Pertanto la valutazione delle risposte cellulari ad inquinanti di diversa natura non può prescindere da un'attenta analisi delle condizioni ambientali di contorno, che specie in organismi ectotermi e soggetti a frequenti fenomeni di ipossia, quali appunto i molluschi bivalvi, sono in grado di condizionare pesantemente l'espressione del fenotipo MXR.

2.SCOPO DELLA RICERCA

La contaminazione degli ecosistemi marino-costieri da parte di residui farmaceutici rappresenta una problematica attuale riconosciuta a livello globale. Nonostante gran parte dei farmaci sia regolarmente apprezzata a concentrazioni inferiori al limite d'azione previsto dalle linee guida EMEA (0,01µg/L) e alle dosi in grado di generare effetti acuti negli organismi acquatici (mg/L) (*Fent et al.*, 2006), è ormai chiaro che alcune specie possano manifestare alterazioni metaboliche significative come conseguenza di una lunga esposizione a basse dosi di farmaco, che spesso si protrae per l'intera durata del ciclo vitale. Alcuni composti, specie quelli ad azione prolungata, sono infatti disegnati per esercitare la loro azione a dosaggi nell'ordine di ng/L. Nel caso in cui le specie esposte possiedano i medesimi bersagli cellulari dell'organismo target, una simile regolazione potrebbe comportare la comparsa di effetti specifici, attesi sulla base del meccanismo d'azione terapeutico. Sono d'altra parte possibili anche effetti aspecifici, nel caso in cui i bersagli siano coinvolti nella regolazione di funzione differenti nelle specie non target (*Fent et al.*, 2006; *Gunnarson et al.*, 2008; *Schmitt et al.*, 2009; *Christen et al.*, 2010). E' possibile quindi prevedere comparsa di effetti inattesi negli organismi acquatici, specie nel caso in cui i processi fisiologici coinvolti nella regolazione farmacologica non siano ancora del tutto caratterizzati per le specie in esame. Oltre a ciò, non va esclusa la possibilità che tali composti si possano accumulare nei tessuti degli animali soggetti a lunghe esposizioni e sviluppare i loro effetti secondariamente in determinate condizioni o fasi di sviluppo. Ciò è confermato da recenti studi che hanno inoltre rivelato l'importanza di alcuni parametri ambientali nel determinare l'assorbimento e l'accumulo dei farmaci negli organismi acquatici (*Brooks et al.*, 2003, 2005; *Daughton e Brooks*, 2011; *Menningen et al.*, 2011).

Su queste basi, lo studio oggetto di questa Tesi è stato effettuato in questo lavoro di tesi è stato finalizzato all'analisi delle possibili alterazioni indotte a livello molecolare dal farmaco antidepressivo fluoxetina (FX) nel mitilo mediterraneo *Mytilus galloprovincialis*. Tale composto appartiene alla famiglia degli inibitori selettivi del reuptake presinaptico della serotonina (SSRI), ed è regolarmente prescritto nella terapia delle patologie depressive associate a fenomeni ossessivo-compulsivi, o nella cura della bulimia nervosa (*Brooks et al.*, 2003). Il suo meccanismo d'azione determina nell'uomo un'iperstimolazione del sistema serotoninergico in seguito ad un aumento delle concentrazioni di serotonina a livello delle fessure sinaptiche. Nei molluschi bivalvi la serotonina (5-HT, 5-idrossitriptamina) svolge un ruolo chiave nella regolazione di diversi

processi vitali, tra cui maturazione delle gonadi, rilascio dei gameti, movimento delle ciglia branchiali e contrazione della muscolatura liscia e striata (*Scheide e Dietz, 1986; Fong e Warner, 1995; Garnerot et al., 2006, Fabbri e Capuzzo, 2010*) Diversi studi rivelano la capacità da parte della FX di alterare significativamente i parametri legati al ciclo riproduttivo degli organismi acquatici (*Fong, 1998; Fent et al., 2006; Kreke e Dietrich, 2008; Menningen et al., 2008, 2011*). Tuttavia ad oggi non esistono dati in grado di stabilire se gli effetti osservati siano imputabili ad una tossicità diretta del farmaco o alla regolazione farmacologica di specifici bersagli cellulari. Pertanto, sulla base delle conoscenze relative alle dinamiche fisiologiche che regolano le funzioni biologiche nei mitili, è stato valutato se, e in che misura, l'esposizione a concentrazioni di FX paragonabili al range di valori misurati in ambiente, produca effetti specifici sui meccanismi di trasduzione del segnale AMPc-dipendente, la cui regolazione determina gli effetti antidepressivi del farmaco nella terapia umana. Oltre a ciò è stata valutata l'eventuale alterazione di alcuni target biologici correlati ai livelli intracellulari di AMPc, quale l'espressione genica della P-glicoproteina, trasportatore di membrana responsabile del sistema di detossificazione noto come Multi-xenobiotic resistance (MXR). Al fine di ottenere precise indicazioni riguardo gli effetti dose-risposta del farmaco, i mitili sono stati esposti a 5 diverse concentrazioni di FX comprese tra 0,03 e 300 ng/L. Il minor dosaggio somministrato (0,3 ng/L) risulta circa 150 volte inferiore rispetto alle concentrazioni comunemente misurate in ambiente (*Kolpin et al., 2002*), mentre il dosaggio più alto è ascrivibile nel range di concentrazioni misurate nelle acque reflue (*Weston et al., 2001*). L'esposizione al farmaco è stata protratta per una durata complessiva di 7 giorni, in accordo con quanto osservato in precedenti esperimenti effettuati sui mitili, in cui simili periodi di esposizione sono risultati appropriati nel determinare variazioni significative dei livelli di AMPc come risposta a modulatori del segnale chimico cellulare (*Martin-Diaz et al., 2009; Franzellitti et al., 2011*). Le analisi sono state effettuate su due diversi tessuti biologici, ghiandola digestiva e mantello, differenti per funzione biologica e innervazione serotonergica, allo scopo di approfondire le conoscenze circa eventuali differenze nella risposta al farmaco in funzione di processi biologici non del tutto caratterizzati e stabilire una connessione tra gli effetti osservati e il ruolo svolto dal sistema nervoso serotonergico nei tessuti analizzati.

3. MATERIALI E METODI

3.1 ANATOMIA DI *Mytilus galloprovincialis*

La specie selezionata per l'esperimento è il mitilo mediterraneo *Mytilus galloprovincialis* appartenente alla famiglia Mytilidae, ordine Mytiloida, classe Bivalvia, phylum Mollusca. Dal punto di vista ecologico si tratta di un filtratore sessile (Fig. 3.1) che colonizza gli ambienti intertidali in cui vive ancorata a substrati duri per mezzo del bisso, un materiale filamentoso di natura corneo-elastica secreto da una ghiandola bissogena situata sul piede. Esternamente l'animale presenta valve simmetriche di colore nero violaceo compresse latero-lateralmente e tenute insieme da un legamento dentellato, detto cerniera, che articolandosi permette l'apertura delle valve, ed è sotto il diretto controllo di muscoli adduttori, due anteriori uno posteriore. Il meccanismo di apertura e chiusura delle valve (comunemente definito *catch*) permette all'animale di trattenere il volume d'acqua necessario alla sopravvivenza nelle fasi di emersione. Internamente le valve sono ricoperte dal mantello (o *pallio*), una massa tegumentale che svolge un ruolo cruciale nella sopravvivenza dell'organismo grazie all'accumulo di sostanze di riserva utilizzate soprattutto durante il processo di maturazione delle gonadi. Le branchie, situate in una cavità del mantello, svolgono, come in tutti i lamellibranchi, la duplice funzione di garantire gli scambi gassosi e permettere la captazione delle particelle alimentari in sospensione. La filtrazione avviene per mezzo di un flusso unidirezionale di acqua garantito dall'azione modulata di un sifone inalante, che pompa l'acqua all'interno della cavità del mantello esponendola alla superficie branchiale, ed un sifone esalante con cui l'acqua viene espulsa all'esterno. Il sistema circolatorio è di tipo aperto, mentre quello nervoso è costituito da gangli pari e da commisture anastomizzate che permettono l'innervazione dei diversi distretti corporei.

Oltre ad essere una specie edule di grandissimo interesse zootecnico, il mitilo mediterraneo figura tra le specie maggiormente utilizzate come bioindicatori dello stato ecologico degli ecosistemi marino costieri nei programmi di monitoraggio ambientale. Essendo un organismo filtratore sessile in grado di assimilare una vasta gamma di composti di natura antropica, offre la possibilità di effettuare una valutazione complessiva della contaminazione ambientale, soprattutto grazie alle ormai acquisite conoscenze riguardo i pattern che regolano le principali risposte fisiologiche della specie a fattori di stress di diversa natura. I mitili risultano inoltre facilmente allevabili in condizioni di laboratorio, e per questo sono spesso impiegati in test ecotossicologici finalizzati a determinare eventuali

correlazioni tra la presenza di specifici inquinanti nelle acque costiere e l'alterazione dei processi biologici che definiscono il ruolo ecologico della specie negli ecosistemi marino costieri.



Fig.3.1 Colonia di *Mytilus galloprovincialis* adesi a substrato roccioso

3.2. ESECUZIONE DELL'ESPERIMENTO

Gli esemplari di *M. galloprovincialis* utilizzati per il test derivano da un allevamento situato a largo delle coste di Cesenatico, Ravenna.

Il farmaco utilizzato nel presente lavoro di tesi è la fluoxetina (*RS*)-*N*-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenossi]-propan-1-ammina fornita dalla società Sigma Aldrich (Milano, Italy).

Sulla base dei dati di bibliografia relativi alle concentrazioni del composto rilevati in diversi comparti idrici (paragrafo [2.7.1](#)), sono stati allestiti 5 trattamenti sperimentali

corrispondenti a concentrazioni di fluoxetina pari a 0.03 ng/l, 0.3 ng/l, 3 ng/l, 30 ng/l e 300 ng/l.

Il farmaco è stato somministrato giornalmente per la durata complessiva di 7 giorni, insieme alla somministrazione del mangime per filtratori (Coral Diet, Filtrator, Xaqua, Italy), dopo il cambio dell'acqua.

Ogni trattamento è stato realizzato in triplicato all'interno di vasche contenenti 20 individui in un volume complessivo di 10 litri d'acqua di mare mantenuta in condizioni costanti di areazione e temperatura (16°C). Per non alterare il ritmo circadiano dei mitili è stato inoltre riprodotto artificialmente il fotoperiodo naturale del periodo dell'anno corrispondente al prelievo.

Ai fini delle nostre analisi è stato campionato per ogni vasca un pool di 3 individui, per ognuno dei quali sono stati prelevati campioni di ghiandola digestiva e mantello, congelati in azoto liquido e conservati a -80°C sino al momento del loro utilizzo.

3.3. LIVELLI DI AMP-ciclico

3.3.1. PRINCIPIO DEL METODO

I livelli tissutali di AMPc sono stati quantificati utilizzando un metodo immunoenzimatico colorimetrico (saggio ELISA) utilizzando il kit DetectX® Direct Cyclic AMP (cAMP) Enzyme Immunoassay kit (Arbor Assays).

Tale metodologia permette una quantificazione indiretta dei livelli di AMPc all'interno dei campioni per mezzo della misurazione di un segnale fotometrico generato dal legame tra un anticorpo specifico per AMP-ciclico e dell'AMPc esterno ai campioni, coniugato con un enzima, la perossidasi, in grado di indurre il segnale di rilevazione.

3.3.2 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI ED ESECUZIONE DEL SAGGIO

Per ogni campione, circa 50 mg di ghiandola digestiva o mantello sono stati omogenati in 500 µL di acido tri-cloroacetico 6% (peso/volume) e centrifugati per 15 minuti a 2000 xg a

4°C. I sovrantanti acquosi vengono sottoposti ad una serie di 4 lavaggi con etere dietilico saturato in acqua (rapporto 1:4), quindi portati ad essiccazione e conservati a -20°C fino al momento del loro utilizzo ai fini del dosaggio.

Il saggio è stato effettuato seguendo le istruzioni del kit ed utilizzando un lettore per micropiastre (ELX-808, BioTek) per il dosaggio spettrofotometrico ($\lambda = 450$ nm). I valori relativi alle concentrazioni di AMPc nei campioni vengono estrapolati interpolando i dati in una curva di calibrazione ottenuta a partire da diluizioni in serie di una soluzione di AMPc a concentrazione nota (Figura 3.2). I livelli tissurali di AMPc sono stati espressi come pmolAMPc/g di tessuto (peso fresco).

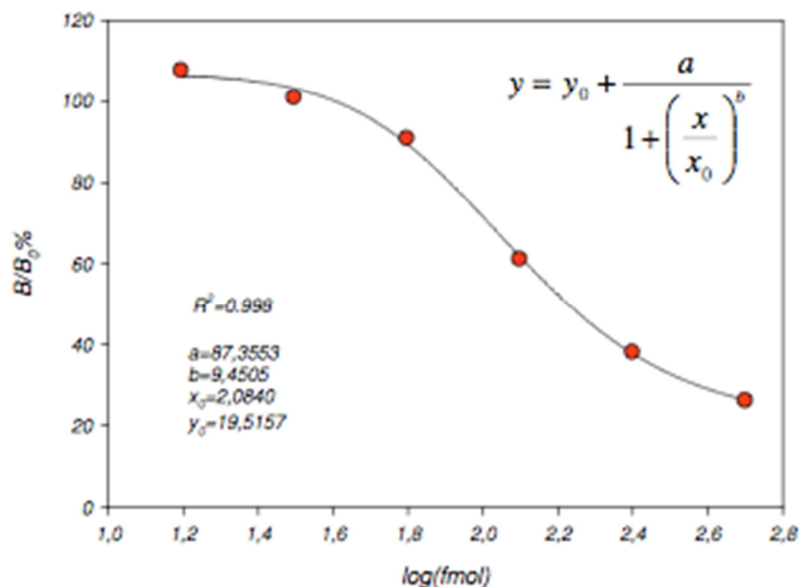


Figura 3.2. Esempio di curva di calibrazione per il dosaggio del AMPc mediante saggio ELISA

3.4. ATTIVITA' DELLA PROTEIN CHINASI AMPc-DIPENDENTE (PKA)

I campioni della ghiandola digestiva e del mantello sono stati omogeneizzati a 4°C con una opportuna soluzione tampone di estrazione contenente Tris HCl 25 mM (pH 7,4), 0,5 mM di EDTA, 0,5mM di EGTA, 10 mM β -mercaptoetanolo, e un cocktail di inibitori delle proteasi alla diluizione 1:50. Gli omogenati sono stati centrifugati a 14000 xg per cinque

minuti a 4°C, al termine dei quali è stato prelevato il sovranatante e mantenuto a -80°C fino al momento dell'uso.

L'attività della PKA è stata valutata attraverso il kit PepTag® Non-Radioactive cAMP-Dependent Protein Kinase Assay (Promega). Il metodo si basa sulla proprietà dell'enzima di fosforilare uno specifico substrato, in questo caso rappresentato da un peptide marcato con una molecola fluorescente (KemptidePepTAG A1 Peptide). La fosforilazione del peptide da parte dell'enzima determina una variazione della sua carica netta da +1 a -1 (Figura 3.3). Ciò permette la separazione della forma fosforilata e di quella non fosforilata mediante elettroforesi su gel d'agarosio (Figura 3.4).

La misurazione della fluorescenza della banda corrispondente al peptide fosforilato è stata effettuata utilizzando un fluorimetro Jasco modello FP-6200 (lunghezza d'onda di eccitazione = 540 nm; lunghezza d'onda di emissione = 568 nm). L'attività enzimatica è espressa in nmol/min/mg proteine totali. La quantità di proteine totali, presente nei campioni è stata misurata mediante il metodo di Lowry (*Lowry et al.*, 1951).

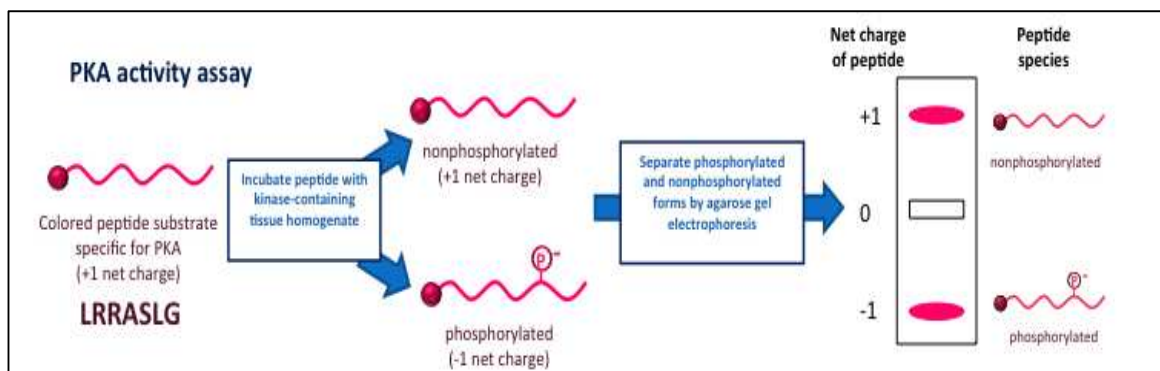


Figura 3.3. Schema del saggio per l'attività della PKA (adattato dal manuale di istruzioni del kit PepTagAssay, Promega).

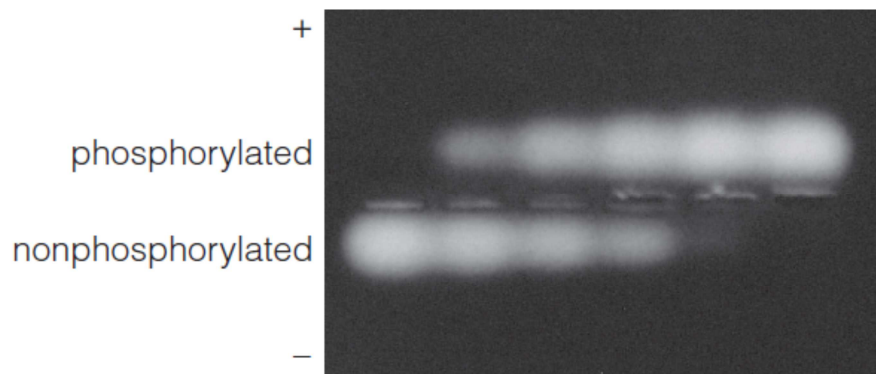


Figura3.4. Esempio di separazione delle bande corrispondenti al peptide fosforilato (+) e non fosforilato (-) (manuale di istruzione del kit PepTagAssay, Promega)

3.5. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI PGP E RECETTORI 5HT MEDIANTE PCR SEMI-QUANTITATIVA *REAL TIME*.

3.5.1. ESTRAZIONE DELL'RNA

L'estrazione di RNA è stata eseguita su circa 100 mg di tessuto di ghiandola digestiva e mantello. Il protocollo di esecuzione utilizzato è quello descritto da *Chomczynski e Sacchi* (1987), e prevede l'omogenizzazione dei campioni di tessuto nel reagente Trizol (Life Technologies), la precipitazione dell'RNA totale mediante aggiunta di isopropanolo, e la risospensione dell'RNA in acqua micro-filtrata (mQ) sterile. L'RNA estratto è stato risospeso in un opportuno volume di acqua micro-filtrata (mQ) sterile, ed è stata effettuata una verifica quali-quantitativa sia mediante lettura allo spettrofotometro ($\lambda = 260$ nm) sia mediante elettroforesi orizzontale su gel denaturante (*Sambrook et al.*, 1989).

3.5.2 RETROTRASCRIZIONE

Principio del metodo

La retrotrascrizione è la reazione che permette di ottenere, a partire da un filamento di RNA, una molecola di DNA ad esso complementare (cDNA). La reazione è catalizzata dalla trascrittasi inversa (o DNA polimerasi RNA-dipendente), un enzima che utilizza l'RNA come stampo di partenza catalizzando la sintesi di cDNA attraverso la

polimerizzazione di deossinucleotidi-trifosfato (dNTPs). La sintesi del cDNA è resa possibile dall'utilizzo di oligonucleotidi sintetici detti inneschi (o *primers*) che, appaiandosi alla sequenza dell'RNA ad essi complementari, costituiscono un piccolo tratto a doppio filamento dal quale la trascrittasi inversa può iniziare la sintesi del filamento stampo. In questo lavoro di Tesi sono stati impiegati dei primers a sequenza arbitraria (*random primers*), che si vanno a legare a diverse regioni delle molecole di RNA, massimizzando quindi la resa della reazione.

Fasi della reazione

Per ogni campione, il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 µg di RNA totale, in presenza di 250 ng di random primers (Sigma Aldrich) e 200 unità dell'enzima RevertAID H minus M-Mulv Reverse Transcriptase (Fermentas). La reazione di retrotrascrizione consiste in tre fasi di incubazione:

- ibridazione dei random primers sui filamenti di RNA (25°C, 10 minuti);
- Retrotrascrizione (45°C, 60 min.)
- Inattivazione dell'enzima (70°C, 10 min.)

Al termine del processo i campioni di cDNA sintetizzato vengono conservati ad una temperatura di -20°C fino al momento del loro utilizzo.

3.5.3. *Real Time* PCR

Principio della Reazione a catena della DNA polimerasi (PCR)

La Polymerase Chain Reaction (PCR) è una tecnica che permette l'amplificazione in vitro di un singolo tratto genico o di una determinata sequenza di DNA. Messa a punto da Kary B. Mullis nel 1984, l'importanza scientifica di questa metodologia salì agli onori della cronaca nel 1993, anno in cui valse allo scienziato il premio Nobel per la chimica. Il successo di tale metodo risiede nella duplice funzione da esso assunta in ambito scientifico. Difatti, la reazione a catena della polimerasi, oltre a fornire una disponibilità teoricamente infinita del materiale genetico selezionato ai fini di successive applicazioni, permette il riconoscimento e la quantificazione dell'espressione di specifici prodotti genici in tutti gli organismi viventi. Quest'ultimo aspetto può consentire la caratterizzazione dei processi fisiologici delle specie, nonché l'analisi delle risposte endogene a particolari condizioni di interesse attraverso la valutazione quali-quantitativa

dell'espressione dei geni direttamente coinvolti nella regolazione di determinati processi metabolici.

Il principio che sta alla base del metodo è la riproduzione artificiale delle condizioni fisiche e chimiche che permettono in vivo la duplicazione del DNA. A tal proposito viene utilizzata una DNA polimerasi sintetica (*Taq polimerasi*) in grado di attivare l'amplificazione servendosi di deossinucleotidi-trifosfato (*dNTPs*). Il riconoscimento del tratto genico di interesse avviene grazie all'utilizzo di segmenti di innesco o primer rappresentati da oligonucleotidi sintetici lunghi 10-30 pb, complementari alle regioni di entrambi i filamenti della doppia elica che fiancheggiano il frammento genico da amplificare. Appaiandosi a tali regioni, i primer danno origine a un sito catalitico per la *Taq polimerasi* che produrrà la polimerizzazione dei filamenti attraverso dei legami fosfodiesterici tra l'innesco e i *dNTP* complementari allo stampo in direzione 5' - 3'.

La PCR prevede il succedersi di diversi cicli termici d'amplificazione. Ogni ciclo termico si compone di 3 fasi:

- 1. denaturazione:** separazione dei due filamenti che costituiscono la doppia catena del DNA
- 2. appaiamento degli inneschi (annealing):** i primers si appaiano alle sequenze complementari sui due filamenti stampo. La temperatura di annealing è un parametro variabile capace di determinare la specificità della reazione, quindi può variare in funzione dei frammenti che devono essere amplificati e dei primers utilizzati, ma in generale è compresa tra i 40 e 60°C.
- 3. estensione:** la temperatura viene innalzata ad un valore in genere intermedio tra quello di denaturazione e quello di appaiamento (68-72°C), che risulti ottimale per l'attività della DNA polimerasi; questa catalizza l'estensione dei filamenti di nuova sintesi a partire dall'estremità ossidrilica 3'.

In teoria quindi ad ogni ciclo termico il numero di copie della sequenza bersaglio aumenta in maniera esponenziale fino al raggiungimento di un plateau in corrispondenza del quale la reazione viene bloccata.

Amplificazione e quantificazione genica mediante *Real Time PCR*

Nel presente lavoro di tesi l'analisi dell'espressione del gene ABCB1, codificante per Pgp, e del gene codificante per il recettore 5-HT₁ di mitilo è condotta per mezzo di un

protocollo di PCR quantitativa *real time* (qPCR). Questa tecnica monitora la cinetica della reazione di PCR in “tempo reale” rilevando la fluorescenza emessa durante la reazione da un cosiddetto *reporter*, cioè un indicatore della produzione dell’amplificato durante ogni ciclo di PCR, in particolare durante la fase lineare di aumento della reazione, cioè quando si può stabilire una relazione lineare tra la quantità di prodotto di PCR e la quantità iniziale dell’RNA corrispondente al gene bersaglio contenuto nel template, consentendo, pertanto, di stimare indirettamente l’espressione del gene nel campione in esame. I *reporter* disponibili per la quantificazione genica mediante *real time* differiscono tra loro per intensità di fluorescenza relativa e la tipologia di legame con i prodotti di reazione. Nel nostro caso il reporter utilizzato è il Sybr Green I, un agente intercalante aspecifico in grado di emettere fluorescenza quando si lega in prossimità del solco minore della doppia elica del DNA. Un apposito software acquisisce lo spettro di emissione di ogni singolo campione per tutta la durata della PCR e converte la variazione di fluorescenza del reporter in una rappresentazione grafica in tempo reale della cinetica d’amplificazione.

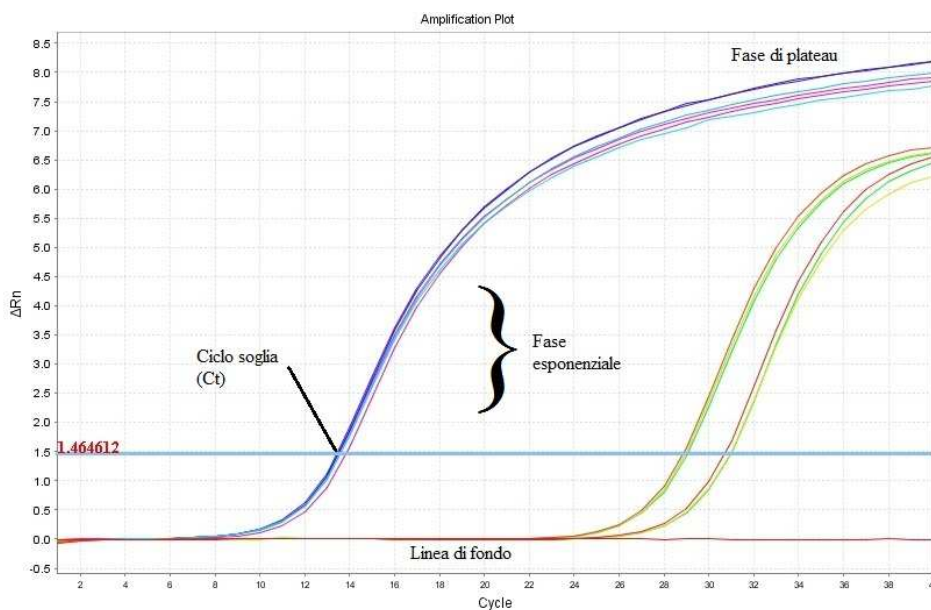


Figura 3.5 Schema raffigurante la cinetica di reazione di una PCR *real time*. La linea rossa rappresenta il valore di fondo della fluorescenza, la linea azzurra è la soglia oltre la quale la fluorescenza del campione è significativa rispetto al valore di fondo, le linee blu e verdi rappresentano l'amplificazione del campione, tramite la sua fluorescenza. Ct è il "ciclo soglia", durante il quale la fluorescenza del campione ha superato la soglia di rilevanza rispetto al valore di fondo

Dal grafico sono dunque estrapolati i parametri fondamentali ai fini della quantificazione. In particolare viene preso in considerazione il ciclo soglia (Ct) ovvero il ciclo termico che determina un aumento statisticamente significativo del segnale di fluorescenza rilevato al di sopra del valore di soglia (*Gibson et al.* 1996) che determina l'inizio della fase lineare dell'amplificazione (Figura 3.5). Di conseguenza, per ogni campione si otterrà un valore di Ct inversamente proporzionale al contenuto di cDNA bersaglio presente all'inizio della reazione. Per gli scopi di questa Tesi è stato impiegato un protocollo di quantificazione relativo, che prevede l'analisi dell'espressione dei prodotti genici bersaglio avvenga contemporaneamente all'analisi di controlli endogeni utilizzati per la normalizzazione dei dati. I primers utilizzati per l'amplificazione specifica dei due prodotti genici bersaglio *ABCBI* e *5HT₁* e dei controlli endogeni sono riportati in Tabella 3.1.

Tabella3.1. Dati relativi ai primers utilizzati ai fini dell'amplificazione i geni bersaglio e dei controlli endogeni

Target / RNAdi riferimento	Sequenza dei primer 5'-3'	Dimensioni amplicone (bp)	Efficienza di amplificazione (%)	Riferimenti
<i>MgABCBI</i>	CACCATAGCCGAGAACATCC	139	112	Questo studio*
	CTCCACGCTCTCCAACACTAG			
<i>5-HT₁</i>	CAGCTGCAAGATCGAGGATT	130	117	Cubero-Leon et al. (2010)
	TGAAGCCATCTTGACTGACG			
<i>Actin</i>	GTGTGATGTCATATCCGTAAGGA	120	114	Banni et al. (2011)
	GCTTGGAGCAAGTGCTGTGA			
<i>Tubulin</i>	TTGCAACCATCAAGACCAAG	135	102	Cubero-Leon et al. (2012)
	TGCAGACGGCTCTCTGT			
<i>Elongation factor $\alpha 1$</i>	CGTTTTGCTGTCCGAGACATG	135	99	Ciocan et al. (2011)
	CCACGCCTCACATCATTCTTG			
<i>RNA helicase</i>	GCACTCATCAGAAGAAGGTGGC	129	132	Cubero-Leon et al. (2012)
	GCTCTCACTTGTGAAGGGTGAC			
<i>18S</i>	TCGATGGTACGTGATATGCC	90	95	Dondero et al. (2005)
	CGTTTCTCATGCTCCCTCTC			
<i>28S</i>	AGCCACTGCTTGCAAGTTCTC	142	94	Ciocan et al. (2011)
	ACTCGCGCACATGTTAGACTC			

I primers utilizzati per l'amplificazione specifica dei due prodotti genici bersaglio *ABCB1* e *5HT₁* e dei controlli endogeni sono riportati in Tabella 3.1. I primers specifici per *ABCB1* sono stati costruiti sulla base di una sequenza parziale ottenuta precedentemente nel nostro laboratorio (Numero di accesso in GenBank: EF057747; Franzellitti e Fabbri, 2006) e utilizzando software specifici per la costruzione di primers utilizzabili in protocolli di PCR *real time*. I primers specifici per *5HT₁* sono invece riportati da Cubero-Leon *et al.* (2010).

Le reazioni sono state condotte in un sistema per PCR *real time* del tipo StepOne (Life Technologies), impiegando un protocollo termico standard del tipo “*fast mode*”. Sia per l'amplificazione dei geni bersaglio che per i controlli endogeni, le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 10 µL contenente: la Fast Sybr Green mater mix (Life Technologies) 2X contenente tutti i reagenti necessari per l'amplificazione (DNA polimerasi, dNTPs, ecc...) e il reporter Sybr Green I, i due primers forward e reverse, ciascuno alla concentrazione 0,2 µM, e una quantità di cDNA corrispondente a circa 15 ng di RNA totale di partenza.

In accordo con le linee guida internazionali che definiscono i criteri di validità e qualità per i protocolli di qPCR (linee guida MIQE, *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time Experiments*; Bustin *et al.*, 2009), per ciascuna coppia di primers è stata necessaria una fase di messa a punto preliminare in cui è stata verificata la specificità dell'amplificazione mediante analisi dei prodotti di PCR via elettroforesi su gel d'agarosio, ed è stata determinata l'efficienza della reazione di amplificazione, che è definita come: $E = [(10^{-1/\text{slope}}) - 1] * 100$

L'efficienza della reazione viene quindi calcolata dalla pendenza (slope) di una retta di regressione Ct vs quantità nominale di RNA ottenuta a partire da diluizioni scalari di un campione di cDNA (ciascuna diluizione è stata analizzata in triplicato) (Figura 3.6).

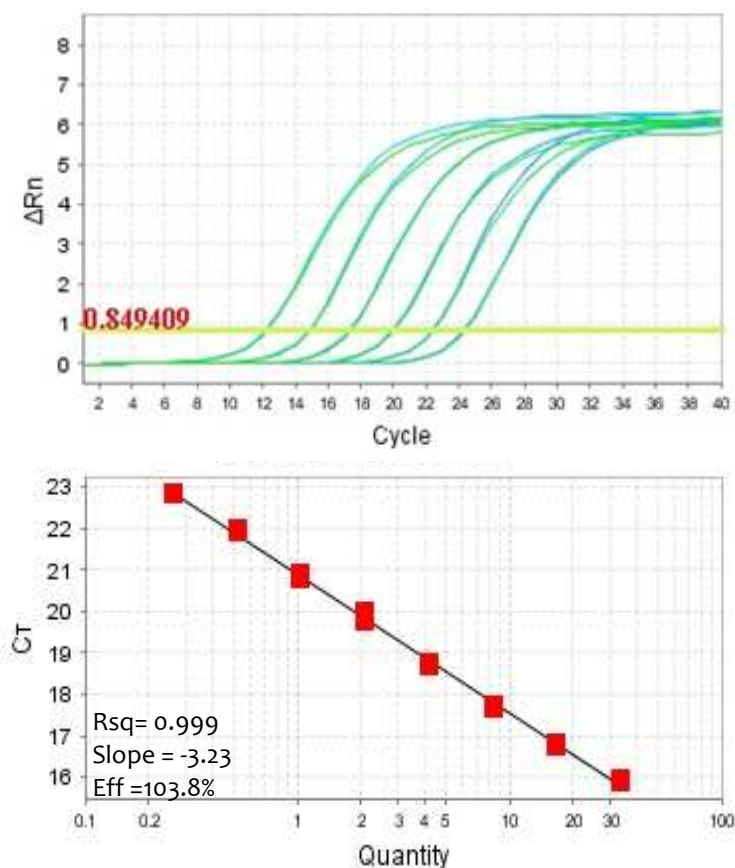


Figura 3.6. Rappresentazione grafica delle fasi sperimentali necessarie al calcolo dell'efficienza di reazione dei primers testati. In alto cinetica di amplificazione ottenuta mediante diluizioni scalari di un campione di cDNA. In basso, retta di regressione tra i i cicli soglia ottenuti e la quantità di RNA prodotta.

Lo standard internazionale prevede i seguenti criteri di qualità per la determinazione dell'efficienza di reazione di qPCR:

1. riproducibilità: la deviazione standard fra i Ct dei replicati per ciascun punto della retta deve essere sempre inferiore a 0.5;
2. linearità, il coefficiente di correlazione della retta deve essere maggiore o uguale a 0.99;
3. l'efficienza della reazione deve essere compresa tra il 90-120%.

Inoltre, sia nella fase di messa a punto che nella fase di analisi dei campioni sperimentali, dopo ogni reazione di amplificazione è stata effettuata una curva di dissociazione (*curva di melting*) per verificare l'assenza di prodotti di amplificazione aspecifici che alterino la validità del risultato ottenuto. I campioni vengono portati lentamente dalla temperatura specifica per l'annealing dei primers a una temperatura di 95°C, in modo tale da

determinare la temperatura di dissociazione (melting point) caratteristica per ciascuna coppia di primers nelle condizioni in cui viene effettuato il saggio. Questo valore viene visualizzato nel grafico della curva di dissociazione come un picco corrispondente alla temperatura in cui la maggior parte dei primers si è dissociata dal filamento di DNA stampo (Figura 3.7). Picchi multipli indicano, pertanto, la presenza di più prodotti di amplificazione nello stesso campione, che verrà quindi scartato dall'analisi finale in quanto giudicato di scarsa qualità.

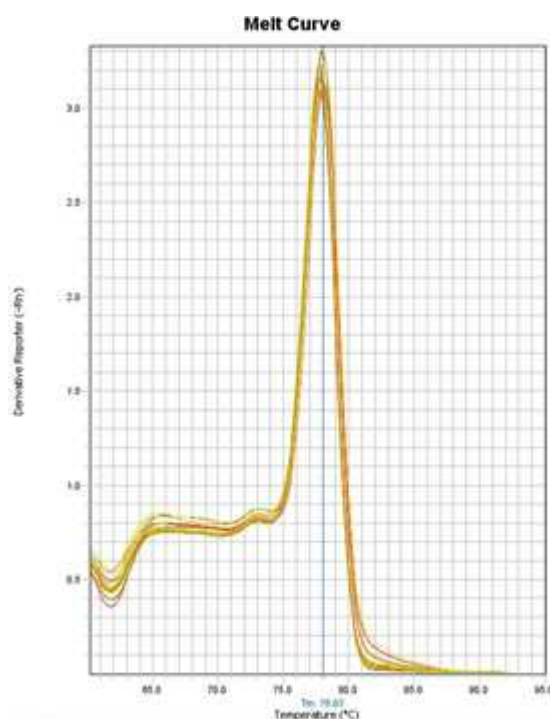


Figura 3.7. Esempio di curva di dissociazione in cui non sono visibili amplificati aspecifici

Al termine della reazione i risultati relativi alle variazioni nell'espressione dei geni bersaglio nei trattamenti sperimentali vengono espressi in termini di rapporti di induzione (Fold change) rispetto al controllo sperimentale, normalizzati sui livelli di espressione del controllo endogeno. La scelta del migliore o dei migliori controlli endogeni per una accurata quantificazione relativa dell'espressione genica è un problema piuttosto dibattuto in letteratura. In questo lavoro di Tesi abbiamo seguito le indicazioni delle linee guida MIQE adottando una strategia per la normalizzazione dei dati basata sulla valutazione preliminare sulla stabilità dei livelli di espressione di un set di controlli endogeni nei campioni sperimentali utilizzando il software geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Questo

software analizza i valori di Ct per il set controlli endogeni candidati nell'insieme dei campioni sperimentali, e classifica dai geni più stabili a quelli meno stabili. I 6 controlli endogeni valutati in questo lavoro di tesi sono riportati in Tabella X. La valutazione preliminare della stabilità mediante geNorm ha quindi stabilito che 18S rRNA e EF1 α risultano i prodotti genici più stabili nelle condizioni sperimentali analizzate, e sono stati quindi utilizzati come controlli endogeni per la normalizzazione dei dati nei saggi definitivi (Fig 3.8).

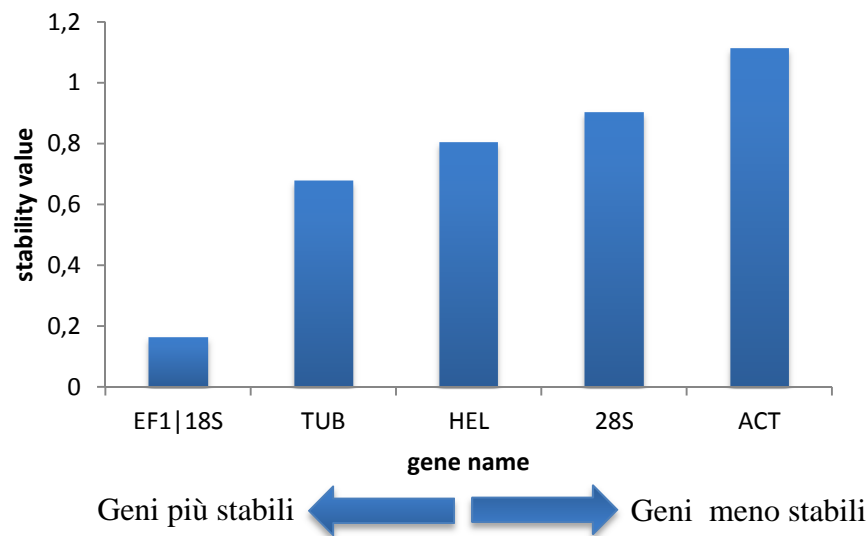


Figura 3.8. livelli di stabilità dell'espressione genica dei controlli endogeni testati attraverso il software GeNorm

Il calcolo dei fold change è stato effettuato attraverso il software StepOne (Life Technologies), che utilizza il metodo di quantificazione relativa descritto da *Livak e Schmittgen* (2008); questo si basa sul confronto dei valori di Ct rilevati per il gene bersaglio tra il campione in esame (in questo caso il cDNA ottenuto dagli organismi sottoposti al trattamento) e un campione di riferimento (cioè il controllo sperimentale) attraverso le seguenti formule matematiche:

- i valori di Ct ottenuti per ciascun trattamento e per il controllo vengono normalizzati rispetto ai controlli endogeni:

$$\Delta Ct = Ct(\text{gene bersaglio}) - Ct(\text{media geometrica controllo endogeno})$$

- le variazioni relative dei livelli d'espressione vengono quindi definite come:

$$FI = (1+E)^{-\Delta\Delta Ct} = (1+E)^{-[\Delta Ct(\text{trattato}) - \Delta Ct(\text{controllo})]}$$

E è l'efficienza della reazione di PCR.

3.6. ANALISI STATISTICA

Tutti i parametri biologici sono stati analizzati su 3 pool di tessuto provenienti da mitili campionati in maniera casuale per ogni condizione sperimentale (N=3). La significatività dei risultati è stata testata attraverso il software SigmaStat mediante analisi della varianza a 1 via seguita dal test di Bonferroni per i confronti a coppie di gruppi di dati. I dati di espressione genica sono stati analizzati mediante il software REST (Pfaffl et al., 2002) appositamente sviluppato per l'analisi statistica dei dati di real time PCR. La correlazioni tra coppie di parametri è stata valutata mediante il test di Spearmann utilizzando SigmaStat. In ogni caso, le differenze sono considerate statisticamente significative per $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 VARIAZIONE DEI LIVELLI DI AMPc

Le Figure 4.1 a e b mostrano rispettivamente i livelli di AMPc in ghiandola digestiva e mantello misurati alle diverse concentrazioni di FX testate. Nella ghiandola digestiva si osserva una riduzione significativa dei livelli di AMPc rispetto al controllo per i mitili esposti a concentrazioni tra 0,03 e 30 ng/L di FX. Nel mantello i livelli di AMPc risultano ridotti a concentrazioni di 300 ng/L di FX, mentre per i trattamenti nel range di 0,03-30 ng/L non si apprezzano alterazioni significative rispetto ai livelli di controllo.

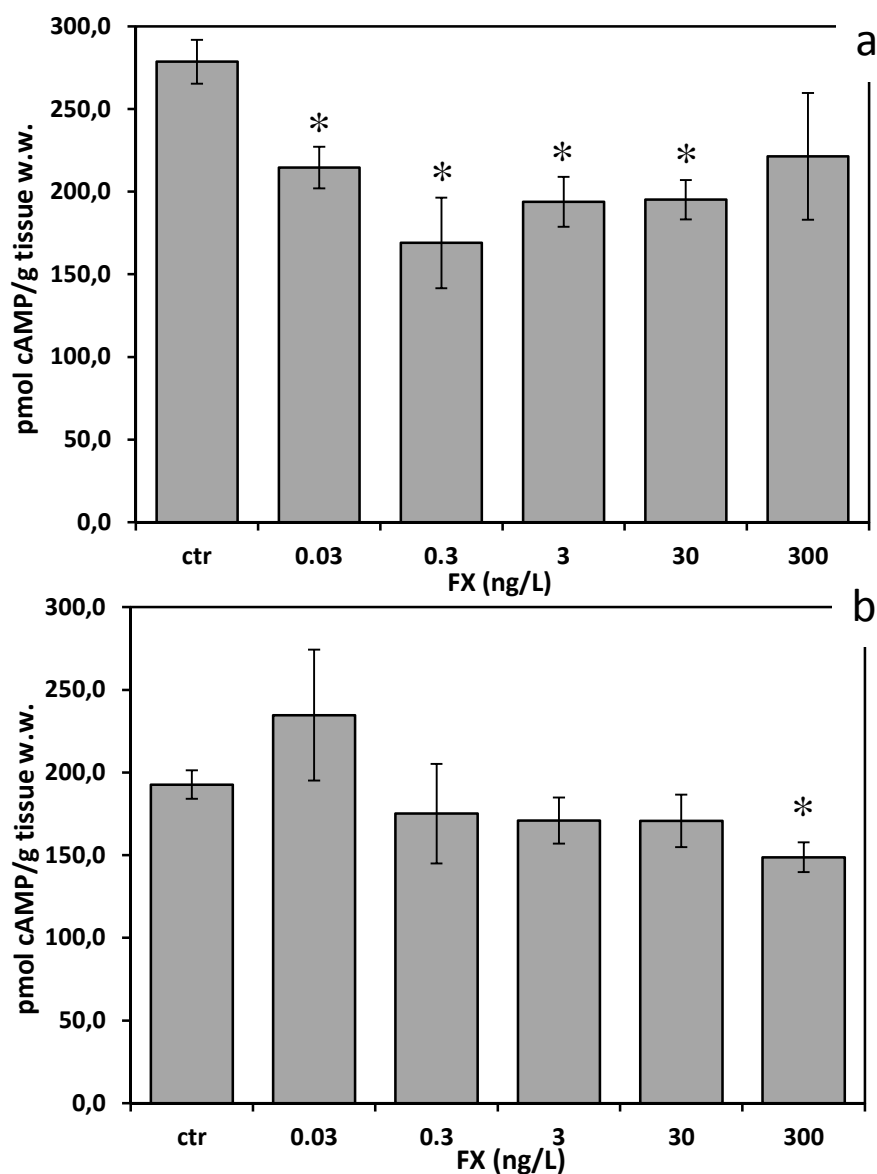


Figura 4.1. Livelli di AMPc in ghiandola digestiva (a) e mantello (b) alle diverse concentrazioni di FX testate (ng/L). I dati rappresentano la media \pm ES (n = 3) dei livelli misurati espressi in pmol cAMP su g di tessuto (peso fresco). Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative tra i mitili trattati e i controlli (1 way ANOVA seguita da Bonferroni test, P < 0.05)

4.2 ATTIVITA' DELLA PROTEIN CHINASI AMPc DIPENDENTE (PKA)

L'attività della PKA dei mitili risulta significativamente ridotta nella ghiandola digestiva alle concentrazioni di FX comprese tra 0,3 e 300 ng/L, mentre per i mitili esposti a 0,003 ng/L si osservano valori simili a quelli misurati nelle serie di controllo (figura 4.2a).

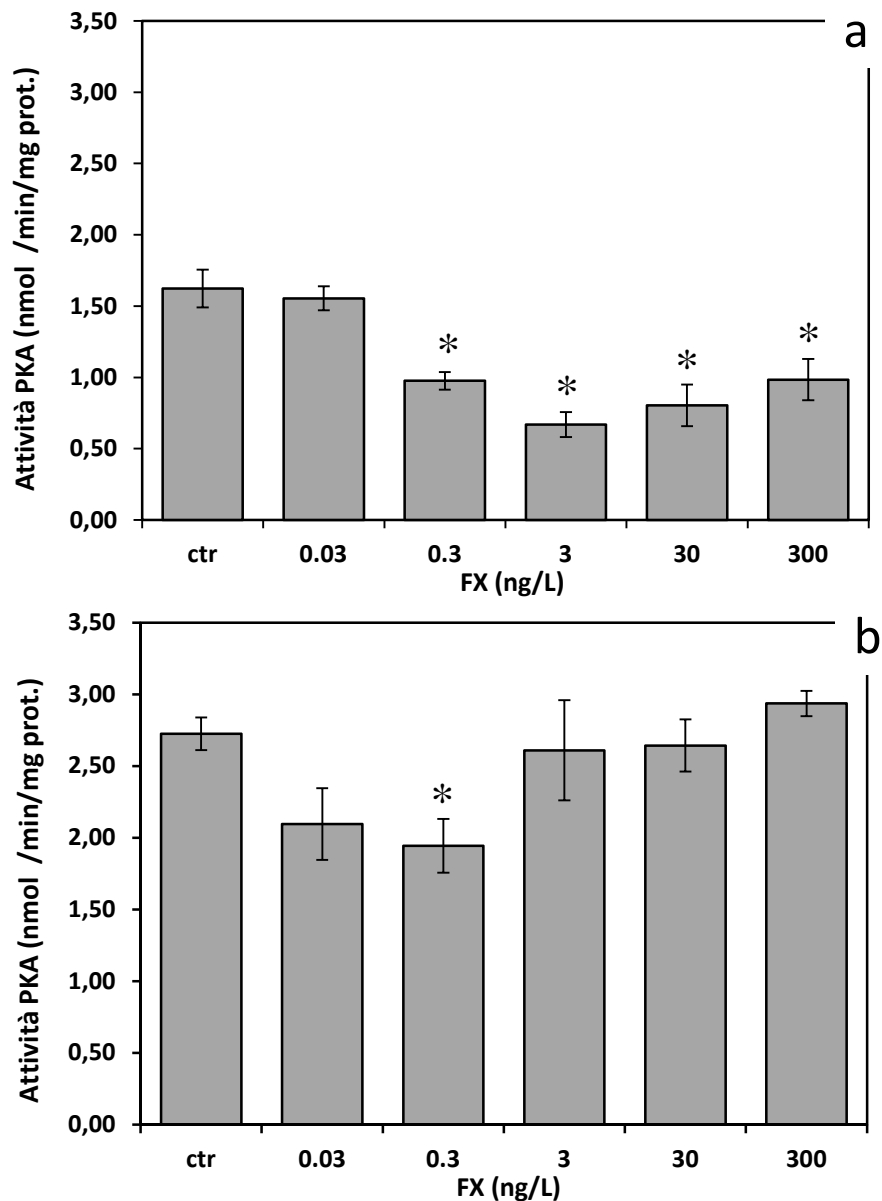


Figura 4.2. Attività della protein chinasi AMPc dipendente (PKA) in ghiandola digestiva (a) e mantello (b) alle diverse concentrazioni di FX testate (ng/L). I dati rappresentano la media \pm ES ($n = 3$) delle nanomoli di enzima fosforilato per minuto su mg di proteine totali. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative tra i mitili trattati e i controlli (1 way ANOVA seguito da Bonferroni)

Nel mantello, una riduzione significativa dell'attività dell'enzima rispetto ai livelli di controllo viene registrata negli animali esposti 0,3 ng/L di FX (figura 4.2b).

4.3. ESPRESSIONE DEL GENE ABCB1 CODIFICANTE PER LA P-GLICOPROTEINA (Pgp)

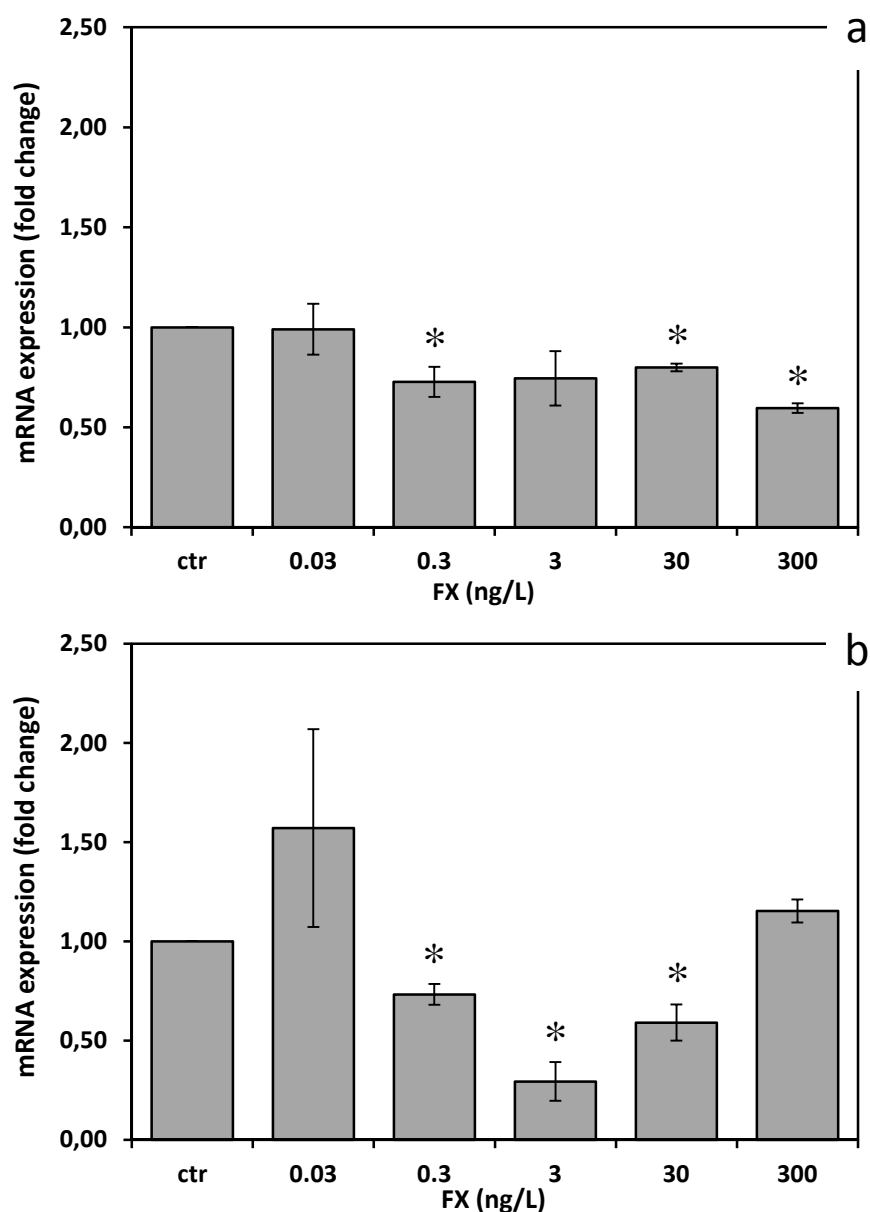


Figura 4.3. Variazione dei livelli di espressione del gene ABCB1 codificante per la p-glicoproteina (Pgp) nella ghiandola digestiva (a) e nel mantello (b) di *M. galloprovincialis* alle diverse concentrazioni di FX testate (ng/L). I dati sono espressi come media \pm ES (n = 3) dei rapporti di induzione (fold change) rispetto al controllo. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative tra i mitili trattati e i controlli (1 way ANOVA seguito da Bonferroni test, P < 0.05)

Nella ghiandola digestiva i trattamenti effettuati hanno determinato una riduzione significativa dell'espressione del gene ABCB1, codificante per la P-glicoproteina (Pgp), alle concentrazioni di 0.3, 30 e 300 ng/L di FX (figura 4.3a), mentre nel mantello si evidenziano livelli di espressione genica statisticamente inferiori rispetto al controllo alle dosi di 0.3, 3, e 30 ng/L di FX (figura 4.3b).

4.4 ESPRESSIONE GENICA DEL RECETTORE 5HT_{Myt1}

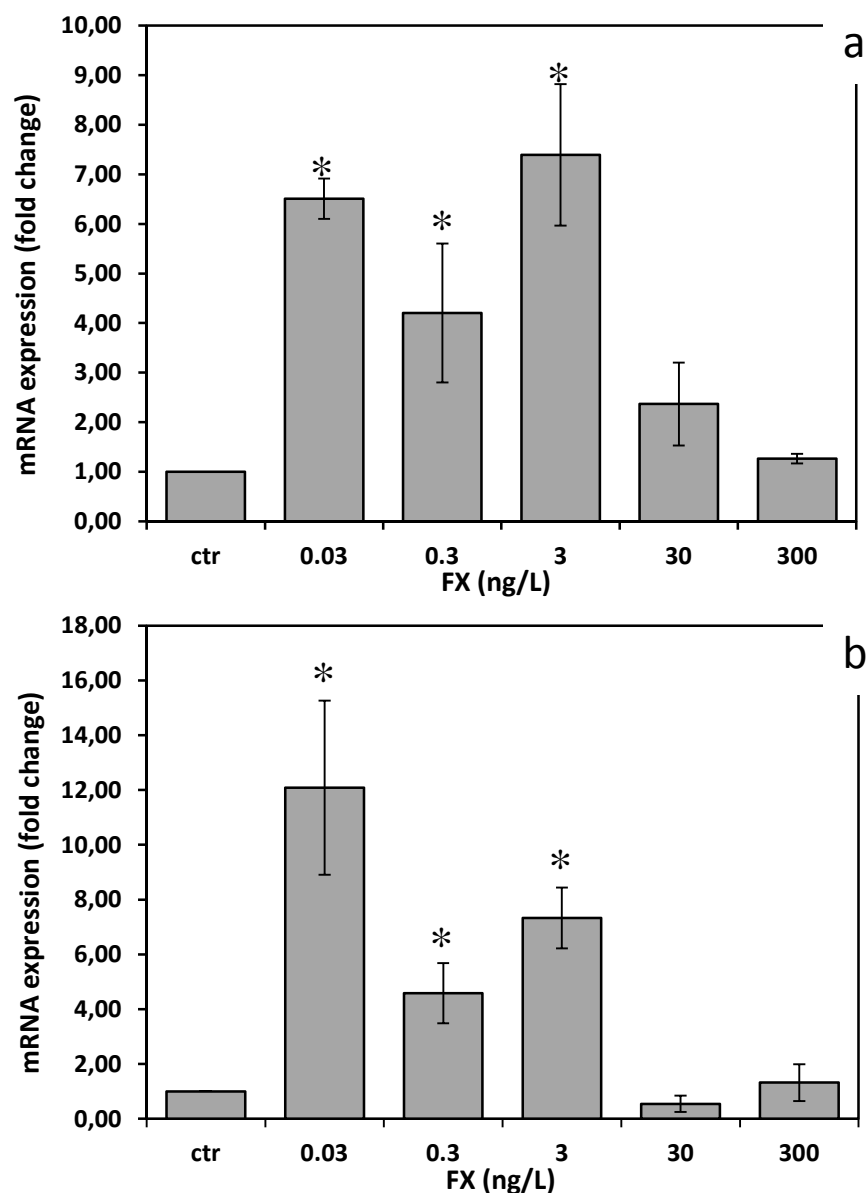


Figura 4.4. Variazione dei livelli di espressione del gene codificante per il recettore 5HT_{myt1} nella ghiandola digestiva (a) e nel mantello (b) di *M. galloprovincialis* alle diverse concentrazioni di FX testate (ng/L). I dati sono espressi come media \pm ES (n = 3) dei rapporti di induzione (fold change) rispetto al controllo. Gli asterischi indicano differenze statisticamente significative tra i mitili trattati e i controlli (1 way ANOVA seguito da Bonferroni test, P < 0.05).

Per entrambi i tessuti analizzati l'espressione del gene codificante per il recettore $5HT_{myt1}$ presenta valori significativamente superiori rispetto ai mitili di controllo nei trattamenti corrispondenti a 0.03, 0.3 e 3 ng/L di FX, mentre a concentrazioni superiori di FX (30 e 300 ng/L) i valori osservati risultano simili ai livelli di riferimento (Figura 4.4 a,b).

4.5. CORRELAZIONE DEI DATI

Tabella 4.1. Coefficiente di correlazione di Spearman tra i parametri molecolari misurati nella ghiandola digestiva e nel mantello dei mitili esposti a FX. Le concentrazioni di farmaco testate sono incluse nell'analisi

	<i>cAMP</i>	<i>PKA</i>	<i>MgPgp</i>	<i>5HT_{myt1}</i>
GHIANDOLA DIGESTIVA				
<i>[FX]</i>	-0.2	-0.8*	0.771*	0.0286
<i>cAMP</i>		0.771*	0.429*	-0.714*
<i>PKA</i>			0.486*	-0.6*
<i>MgPgp</i>				-0.143
<i>5HT1</i>				
MANTELLLO				
<i>[FX]</i>	-0.943*	-0.257	0.371	-0.257
<i>cAMP</i>		0.370	-0.543*	0.486*
<i>PKA</i>			0.143	0.257
<i>MgPgp</i>				-0.6*
<i>5HT1</i>				

[FX], concentrazione di fluoxetina;

cAMP, AMP ciclico;

PKA, protein chinasi AMPc-dipendente;

MgPgp, P-glicoproteina di *Mytilus galloprovincialis* (ABCB1);

$5HT_{myt1}$, recettore della serotonina di mitilo.

*p < 0,05

La Tabella 4.1 riporta i risultati ottenuti dall'analisi della correlazione tra coppie di parametri effettuata mediante il test di Spearman. Le concentrazioni di fluoxetina a cui sono stati esposti i mitili nei diversi trattamenti sono incluse nelle analisi. Tali dosaggi risultano correlati in maniera negativa con i livelli di AMPc nella ghiandola digestiva e con l'attività della PKA nella ghiandola digestiva, al cui interno mostrano inoltre mostrano una correlazione positiva con i livelli di espressione di MgPgp. I livelli intracellulari di AMPc,

risultano significativamente correlati con il profilo di espressione genica di MgPgp in entrambi i tessuti testati. In particolare, tali parametri mostrano una correlazione negativa nella ghiandola digestiva e positiva nel mantello. Tra i livelli di espressione del recettore $5HT_{myt1}$ e i livelli intracellulari di AMPc si osserva una correlazione negativa all'interno della ghiandola digestiva e positiva all'interno del mantello. L'attività della PKA è correlata positivamente con tutti gli endpoint biologici misurati nella ghiandola digestiva, fatta eccezione per i livelli di espressione del recettore $5HT_{myt1}$ con il quale mostra una correlazione negativa.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Molti dei farmaci regolarmente apprezzati in ambiente acquatico possiedono un meccanismo d'azione in grado di generare risposte metaboliche a bassissimi dosaggi. Nel caso in cui gli organismi acquatici conservino dal punto di vista evolutivo gli stessi bersagli molecolari presenti negli organismi target, l'esposizione a concentrazioni di residui farmaceutici nell'ordine dei ng/L potrebbe produrre alterazioni fisiologiche specifiche, o generare effetti aspecifici in funzione del ruolo svolto da tali bersagli nelle specie non target (*Schmitt et al.*, 2009; *Christen et al.*, 2010).

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di analizzare attraverso un approccio di tipo molecolare le possibili alterazioni fisiologiche indotte in *Mytilus galloprovincialis* dal meccanismo d'azione della fluoxetina, farmaco appartenente alla famiglia degli inibitori selettivi della ricaptazione presinaptica della serotonina (SSRI), ampiamente utilizzato nella terapia antidepressiva e nella cura dei disturbi alimentari. Le indagini di impatto ambientale rivelano l'ubiquitarità e le caratteristiche di persistenza di tale composto negli ecosistemi acquatici, in cui viene frequentemente misurato a concentrazioni variabili tra i 12 ng/L, per le acque superficiali e i 540 ng/L per gli effluenti degli impianti di depurazione (*Weston et al.*, 2001; *Kolpin et al.*, 2002). Dal punto di vista farmacologico la fluoxetina possiede una cinetica in grado di sviluppare un' aumento della disponibilità serotonina a livello delle fessure sinaptiche per mezzo di un meccanismo di inibizione della sua ricaptazione a livello presinaptico. Avvalendosi delle recenti acquisizioni circa la caratterizzazione del sistema serotoninergico di mitilo (*Cubero-Leon et al.*, 2010), e sulla base delle conoscenze ormai acquisite circa le dinamiche fisiologiche che regolano le principali funzioni biologiche in questa specie (*Fabbri e Capuzzo*, 2010), sono stati analizzati gli effetti specifici indotti da concentrazioni di fluoxetina paragonabili al range di valori misurato in ambiente, sui target molecolari coinvolti nella risposta terapeutica al farmaco nella terapia umana. Più nel dettaglio è stato analizzato, se, e in che misura, l'esposizione per 7 giorni a dosaggi compresi tra 0.03 e 300 ng/L di FX, produca alterazioni a carico del sistema di trasduzione AMPc-dipendente, e degli endpoint molecolari ad esso correlato, in due diversi tessuti biologici, ghiandola digestiva e mantello.

Nella ghiandola digestiva l'esposizione a diverse concentrazioni di FX ha determinato una riduzione significativa dei livelli intracellulari di AMPc e dell'attività della PKA, mentre

nel mantello non si osservano alterazioni significative dei parametri misurati, lasciando presupporre una diversa modulazione farmacologica tra i due tessuti.

La comunicazione cellulare mediata da AMP ciclico svolge un ruolo cruciale nella regolazione di numerosi processi fisiologici nei molluschi bivalvi (*Fabbri e Capuzzo, 2010*). La recente rivalutazione dell'importanza degli impatti ecotossicologici su tale sistema di comunicazione cellulare, si deve, in buona parte, all'aumento delle conoscenze riguardanti le sue funzioni metaboliche negli organismi acquatici e alla consapevolezza delle ripercussioni che le alterazioni collegate ad alcuni processi biologici fondamentali, come ad esempio la riproduzione, possono determinare a livello di popolazione (*Fabbri e Capuzzo, 2010*). Come ampiamente dimostrato, nei mitili, i livelli di AMPc sono soggetti a variazioni naturali e ad alterazioni conseguenti all'esposizione ad inquinanti di diversa natura, tra cui metalli pesanti (*Dailianis et al., 2005; Fabbri e Capuzzo, 2006; Dailianis e Kolayianni, 2007*), sottoprodotti organici di origine industriale (*Raftopoulou et al., 2006*), biotossine algali (*Buratti et al., 2010*) e prodotti farmaceutici (*Martin-Diaz et al, 2009; Franzellitti et al., 2011*). Il sistema di trasduzione AMPc-dipendente è innescato dall'interazione tra diversi gruppi di ligandi extracellulari di natura peptidica, tra cui adrenalina, noradrenalina e 5HT, e una larga famiglia di recettori associati a proteine G (GPCR). Nei mammiferi sono state caratterizzate 7 tipologie di recettori per la serotonina (5HT₁₋₇). Le classi 5HT_{1,2} e 5HT₄₋₇ fanno parte della superfamiglia dei recettori accoppiati a proteine G (GPCR, G-protein coupled receptor). Il recettore 5HT₃ è invece un recettore ionotropico (*Hoyer et al., 2002*). Nei mitili l'unico recettore della serotonina sinora riconosciuto e sequenziato è il 5HT_{myt1}, il quale presenta un'elevata omologia strutturale con il sottotipo 5HT₁ dei mammiferi (*Cubero-leon et al., 2010*). Si tratta di un recettore accoppiato ad una proteina G_i responsabile dell'inibizione dell'enzima adenilil ciclasi a cui corrisponde una riduzione della concentrazione cellulare di AMPc e dell'attività di enzimi e prodotti di trascrizione ad esso correlati (*Hannon e Hoyer, 2008*).

La riduzione dei livelli di AMPc/PKA osservata nella ghiandola digestiva definisce in maniera chiara la presenza dei bersagli cellulari su cui la FX esercita i propri effetti nella terapia umana in *M. galloprovincialis*. In particolare, si osserva che attraverso l'inibizione del reuptake presinaptico della 5HT, la FX determina un aumento della concentrazione del neurotrasmettitore a livello della fessura sinaptica a cui corrisponde una maggiore

attivazione dei recettori 5HT_{myt1} e, di conseguenza, un aumento dell'effetto inibitorio sul sistema di trasduzione AMPc-dipendente. Tali risultati si discostano in maniera rilevante da quanto precedentemente riportato da *Garnerot e coll.* (2006), i quali descrivono un'apparente assenza di fibre nervose serotoninergiche all'interno della ghiandola digestiva dei molluschi bivalvi. In compenso essi risultano in accordo con i risultati ottenuti in un precedente lavoro di tesi effettuato su *M. galloprovinciaslis* (tesi di LMBM, *I. Tosarelli*, 2012).

Da quanto si evince dai nostri dati, i due tessuti rispondono in maniera differente all'azione della fluoxetina, verosimilmente in relazione ai noti processi fisiologici che si verificano nel mantello in funzione dello stadio di maturazione sessuale dei mitili. A tal proposito occorre tener presente che il prelievo dei mitili utilizzati nel test è stato effettuato nel mese di maggio, che corrisponde, stando alle attuali conoscenze, al periodo dell'anno in cui si verifica l'ultima fase di maturazione sessuale prima dello spawning (*Gabbott et al.*, 1983; *De Zwaan et al.*, 1992; *Villalba et al.*, 1995). L'accesa colorazione del mantello osservata durante il prelievo dei tessuti, ha fornito a tutti gli effetti un'ulteriore conferma dell'avanzato stadio gametogenico degli individui campionati. Analizzando nel dettaglio i dati relativi alle variazioni dell'attività della PKA, si osserva che nel mantello La FX determina un'effettiva inibizione dose-dipendente fino a 0,3 ng/L, a cui corrisponde una riduzione significativa dell'attività dell'enzima, mentre alle concentrazioni maggiori gli effetti del farmaco sembrano diminuire in maniera proporzionata all'aumento delle dosi somministrate. Al contrario, nella ghiandola digestiva, pur essendo effettivamente riconoscibile tale andamento, gli effetti della FX sull'attività dell'enzima risultano significativi anche alle più alte concentrazioni. In accordo con i nostri dati, diversi test ecotossicologici condotti su organismi acquatici al fine di valutare gli effetti di farmaci SSRI sui processi legati alla riproduzione, rivelano frequenti alterazioni a dosaggi medio-bassi ed effetti blandi o assenti a concentrazioni maggiori (*Schmitt et al.*, 2009). Simili risposte sono oltretutto ancor più marcate nei test aventi come oggetto di studio le alterazioni del ciclo riproduttivo indotte dalla FX negli invertebrati acquatici, tra cui crostacei e molluschi (*De lange et al.*, 2006; *Sanchez-Arguello et al.*, 2009; *Gust et al.*, 2009). *Fong e coll.* (2003) hanno a tal proposito ipotizzato che a concentrazioni molto elevate, la FX possa fungere da antagonista dei recettori serotoninergici determinando la diminuzione degli effetti specifici che vengono così rappresentati da un particolare

andamento ad U (*U-shaped curve*), tipicamente osservato nelle curve dose-risposta dei ligandi recettoriali. I nostri dati mostrano inoltre un livello di attività basale della PKA circa 1.5 volte maggiore nel mantello rispetto alla ghiandola digestiva e tali differenze risultano confermate in studi precedenti effettuati su mitilo (*Martin-Diaz et al.*, 2009; *Franzellitti et al.*, 2011) a conferma della diversa funzione modulatoria assunta dal sistema di trasduzione AMPc-dipendente nei due tessuti. A tal proposito, precise indicazioni sono fornite dalla differente distribuzione tissutale delle due isoforme della PKA (PKA_{myt1} e PKA_{myt2}) precedentemente isolate e caratterizzate nel mitilo mediterraneo sulla base di differenti proprietà biochimiche, chimico-fisiche ed immunogeniche (*Bardales et al.*, 2004). La PKA_{myt1} risulta l'unica isoforma presente nella ghiandola digestiva, mentre entrambi i tipi sono stati riconosciuti all'interno del mantello (*Bardales et al.*, 2009, 2011), in cui risulta peraltro documentata una regolazione significativa dell'attività della PKA_{myt2} in funzione della temperatura che, di riflesso, ne suggerisce un ruolo associato alle fasi stagionali del ciclo riproduttivo (*Bardales et al.*, 2004, 2009).

L'apparente assenza di effetti specifici osservata nel mantello può essere dunque interpretata come una conseguenza dell'interazione tra diversi processi fisiologici operanti attraverso il sistema di trasduzione AMPc dipendente, fenomeno precedentemente documentato nel mantello di altri molluschi bivalvi (*Matsutani e Nomura*, 1986).

Nei mitili, il mantello rappresenta il principale serbatoio di riserve energetiche per i processi fisiologici responsabili della gametogenesi e dello spawning (*Lubet*, 1957), e al suo interno sono state documentate variazioni stagionali dei livelli di AMPc, e del suo effettore AC, strettamente correlate allo stadio di maturazione sessuale e al sesso degli animali (*Mancebo et al.*, 1991, 1992, *Blanco et al.*, 2005). Come ampiamente dimostrato, la 5HT svolge una funzione neuromodulatoria determinante nei processi di maturazione e rilascio dei gameti che avvengono nel tessuto gonadico, il quale si presenta come una massa ghiandolare scarsamente differenziata all'interno del mantello (*Gibbons e Castagna*, 1984; *Osanai*, 1985; *Fong e Warner*, 1995, *Fong*, 1998, *Garnerot et al.*, 2006). Tuttavia, sulla base dei dati disponibili in letteratura, l'attività degli enzimi responsabili dei processi glicolitici e glicogenolitici che si verificano ai fini del processo di maturazione delle gonadi nel mantello dei molluschi bivalvi, è regolata prevalentemente dall'azione delle catecolamine, in particolare noradrenalina e dopamina, il cui meccanismo d'azione determina un innalzamento dei livelli intracellulari di AMPc attraverso un'attivazione dei

recettori β -adrenergici. (Osadaa et al., 1987; Osada e Nomura, 1989; Vazquez-Illanez et al., 1991; Fernandez et al., 1994, 1997; Cao et al., 1995; Martinez et al., 1996; Diaz-Enrich e Ibarguren, 2002; Barth et al., 2007; Lopez-Sanchez et al., 2009). Essendo stata già documentata l'esistenza di uno stretto legame tra la comunicazione cellulare catecolaminergica e serotoninergica nelle dinamiche fisiologiche che regolano il ciclo riproduttivo dei molluschi bivalvi (Matsutani e Nomura, 1986), non è azzardato ipotizzare che nel mantello di mitilo gli effetti specifici della FX siano stati influenzati in maniera considerevole dalla regolazione AMPc-dipendente dei processi fisiologici associati ai fenomeni glicolitici e glicogenolitici. Inoltre va sottolineato che evidenti fenomeni di cross-talk tra il sistema nervoso serotoninergico e quello noradrenergico, sono già stati precedentemente osservati nello studio degli effetti modulatori dei farmaci in *M. galloprovincialis* (Tesi LMBM Ilaria Tosarelli, 2012), oltre ad essere stati precedentemente descritti nella terapia antidepressiva umana caratterizzata dall'assunzione di SSRI (Blier, 2001). Inoltre va sottolineato che nei mitili pur essendo stato isolato e sequenziato esclusivamente il recettore $5HT_{myt1}$, a cui corrisponde un'inibizione della via di trasduzione AMPc-dipendente, esistono chiare evidenze della presenza di ulteriori recettori serotoninergici associati all'aumento dell'attività dell'adenilil ciclasi nelle branchie di mitilo (Fabbri e Capuzzo, 2006). Pertanto non si può escludere che nel mantello i livelli di AMPc e l'attività della PKA siano modulati da tipologie di recettori serotoninergici ad oggi ancora non riconosciute.

Uno dei molteplici aspetti non ancora approfonditi circa le alterazioni di carattere fisiologico indotte dai farmaci negli organismi acquatici riguarda i possibili effetti che essi determinano sulla modulazione dell'espressione genica dei recettori coinvolti nella trasduzione del segnale chimico cellulare. Come detto in precedenza, la fluoxetina inibendo il fenomeno di ricaptazione, determina l'aumento delle concentrazioni extracellulari della serotonina (5HT), che induce i vari effetti biologici ad essa correlati. A sua volta, nei mammiferi, il neurotrasmettitore endogeno 5HT è in grado di regolare l'espressione dei propri recettori. In ragione di ciò, parte del presente lavoro di tesi è stato a valutare se la FX a concentrazioni ambientali sia in grado di influenzare, pur indirettamente, i livelli di espressione del gene codificante per il recettore $5HT_{myt1}$. Sia nel mantello che nella ghiandola digestiva si nota un aumento dell'espressione genica di

5HT_{myt1} alle minori concentrazioni, mentre ai dosaggi più alti i livelli di espressione genica non subiscono alterazioni significative. Ciò dimostra che l'aumento delle concentrazioni extracellulari di 5HT, indotto dalla FX, determina un'effettiva regolazione dell'espressione genica del recettore 5HT_{myt1}, meccanismo peraltro già documentato nei mammiferi, in cui l'espressione di diverse classi di recettori di membrana risulta regolata in modo retroattivo dall'attività dei rispettivi ligandi endogeni (*Collins et al.*, 1992; *Johnston et al.*, 1993). Verosimilmente, il netto calo dell'espressione genica apprezzato a dosaggi maggiori potrebbe essere determinato da un controllo a feedback negativo generato da condizioni di concentrazioni extracellulari di serotonina troppo elevate. Inoltre ciò si ricollega all'ipotesi di *Fong e coll.* (2003) precedentemente descritta circa la possibilità che ad alti dosaggi, la FX possa fungere da antagonista del recettore 5HT_{myt1}, come già precedentemente documentato in studi condotti su mammiferi (*Ni e Miledi*, 1997).

Le informazioni riguardanti la regolazione dei meccanismi di trasduzione del segnale chimico in funzione della disponibilità di recettori sono attualmente molto frammentate per i molluschi bivalvi. Nella ghiandola digestiva le alterazioni indotte dalla FX a carico dell'espressione genica recettoriale determinano un'effettiva inibizione del meccanismo di trasduzione AMPc-dipendente, mentre nel mantello, ad una simile regolazione dell'espressione recettoriale corrisponde un innalzamento dei livelli intracellulari di AMP-ciclico. Essendo nota la funzione inibitoria del recettore 5HT_{myt1} sui meccanismi di trasduzione del segnale AMPc-dipendente, tali dati non forniscono informazioni precise in merito ad una possibile relazione causa-effetto tra le alterazioni dell'espressione genica del recettore e i livelli intracellulari di AMPc, ma piuttosto rappresentano un'ulteriore conferma all'ipotesi precedentemente formulata circa l'influenza all'interno del mantello di dinamiche fisiologiche regolate da sistemi di comunicazione neuroendocrina differenti da quello serotoninergico nella valutazione degli effetti della FX sul sistema di trasduzione del segnale AMPc dipendente.

Un possibile bersaglio del meccanismo d'azione della FX negli organismi acquatici è rappresentato dal sistema di detossificazione cellulare noto come Multi-Xenobiotic Resistance (MXR). Esso rappresenta un meccanismo di estrusione di molecole estranee al metabolismo cellulare ad opera di specifici trasportatori di membrana appartenenti alla

classe delle ATP-binding cassette (ABC). Tra questi la P-glicoproteina (Pgp) risulta essere una delle molecole maggiormente coinvolte nel sistema MXR nei molluschi bivalvi. Il coinvolgimento del sistema di trasduzione AMPc dipendente nella regolazione di tale linea di difesa nell'uomo (conosciuto come MDR, *Multi-Drug Resistance*) fu stabilito diversi anni fa da *Rohlf e Glazer* (1995), e un'ipotesi concernente una simile regolazione negli invertebrati fu in seguito ipotizzata da *Bard* (2000). A tale scopo i due tessuti campionati sono stati sottoposti ad un'analisi dell'espressione del gene ABCB1, codificante per la MgPgp di mitilo. Nella ghiandola digestiva è stato possibile osservare una sottoespressione del gene ABCB1, statisticamente in linea con i valori relativi alle concentrazioni di AMPc e all'attività della PKA. Nel mantello si osserva invece una diminuzione significativa dei livelli di trascrizione genica nei trattamenti a concentrazioni intermedie, a cui però non corrispondono alterazioni significative dei parametri succitati. I risultati ottenuti per quest'ultimo tessuto sono in netta controtendenza con i dati ricavati da precedenti studi condotti su mitilo, in cui era stato possibile evidenziare una significativa correlazione tra le variazioni di AMPc/PKA e l'espressione genica delle proteine responsabili del sistema MXR, suggerendo una possibile regolazione AMPc-dipendente per tale meccanismo di difesa (*Martin-Diaz et al.*, 2009 *Franzellitti et al.*, 2011). Tuttavia, uno studio riguardante gli effetti della yessotossina su determinati endpoint biologici nei mitili dell'adriatico settentrionale rivela una correlazione negativa tra le concentrazioni intracellulari di cAMP e l'espressione genica di MgPgp (*Buratti et al.*, 2010). Ciò lascia ipotizzare l'esistenza di ulteriori dinamiche fisiologiche non ancora ben evidenziate in grado di influenzare significativamente la regolazione del sistema MXR in *M. galloprovincialis*. Nell'uomo è stata ampiamente confermata un'evidente correlazione tra i livelli di trascrizione del gene ABCB1 e condizioni di stress ossidativo. (*Lenahan et al.*, 1995; *Hong et al.*, 2006; *Lu et al.*, 2011). In parallelo con le analisi effettuate ai fini del presente lavoro di tesi, ulteriori indagini portate avanti dallo stesso laboratorio di biochimica e fisiologia ambientale del CIRSA, hanno valutato gli effetti tossici della FX per i diversi trattamenti effettuati attraverso l'utilizzo di una batteria di biomarker. Ciò che emerge è che nella ghiandola digestiva, le concentrazioni di FX che determinano una riduzione dell'espressione del gene ABCB1 producono al contempo una sostanziale attivazione degli enzimi antiossidanti glutatione S-transferasi (GST) e/o catalasi (CAT) (*Tesi di LMAGA, Alessandro Mola*, 2012) in accordo con quanto precedentemente osservato da *Buratti e coll.* (2010). Pur non

essendo stati analizzati i marcatori di stress ossidativo nel mantello, l'ipotesi che possa essersi verificato un simile trend è supportata dai dati ottenuti in studi precedenti che confermano un andamento inverso tra l'attività degli enzimi antiossidanti e i livelli di espressione genica di MgPgp nel mantello di mitili esposti a concentrazioni ambientali di farmaci (*Martin-Diaz et al.*, 2009; *Franzellitti et al.*, 2011). I dati discussi in questa tesi dimostrano quindi che la trascrizione delle proteine responsabili del sistema di difesa MXR nei mitili è influenzata in maniera rilevante dalle alterazioni prodotte sia a livello molecolare che cellulare dalla FX, determinando un aumento della suscettibilità dei mitili ai pericoli derivanti dall'assorbimento di sostanze tossiche.

Nel loro insieme, i risultati ottenuti dimostrano che l'esposizione sub-cronica a concentrazioni di fluoxetina comprese nell'intervallo di valori comunemente misurati in ambiente determina nei mitili significative alterazioni di parametri della trasduzione del segnale e della trascrizione genica. Tali evidenze delineano un profilo di tossicità in netta controtendenza con le informazioni estrapolate dagli studi di tossicità acuta e confermano la capacità da parte di molecole biologicamente attive di produrre effetti specifici negli organismi acquatici anche a concentrazioni fino ad oggi+ considerate irrilevanti dal punto di vista ecotossicologico.

Gli effetti registrati sui parametri correlati al sistema di trasduzione AMPc dipendente rivelano che nei mitili il meccanismo d'azione della fluoxetina determina una modulazione specifica dei medesimi bersagli molecolari coinvolti nella terapia umana, i quali risultano pertanto evidentemente conservati nel corso dell'evoluzione. Tale analisi ha consentito di effettuare delle prime importanti considerazioni circa i fenomeni fisiologici coinvolti nella modulazione dell'output riproduttivo, fenomeno notoriamente indotto dalla fluoxetina somministrata a varie specie di organismi acquatici nelle pratiche di acquacoltura; ciò fornisce al contempo utili acquisizioni circa gli effetti specifici e aspecifici del farmaco in funzione del ruolo rivestito dal sistema nervoso serotonergico nei diversi tessuti biologici analizzati.

L'esposizione al farmaco ha inoltre determinato l'inibizione del sistema di detossificazione MXR, deputato all'escrezione cellulare di sostanze xenobiotiche. Tale effetto comporta un aumento della vulnerabilità dei mitili alle alterazioni prodotte da sostanze estranee al

metabolismo cellulare e pone l'accento sulla possibile comparsa di fenomeni di tossicità sinergica con altre sostanze disciolte in ambiente acquatico.

Infine, l'analisi dell'espressione genica del recettore 5HT_{myt1} ha permesso di identificare un meccanismo di regolazione della sintesi recettoriale in funzione delle concentrazioni extracellulari di serotonina e ha dimostrato la presenza di fenomeni di inibizione della trascrizione genica a dosaggi di farmaco più elevati.

Nei mitili, quindi, la fluoxetina è in grado di indurre l'alterazione di diversi parametri fisiologici a concentrazioni inferiori al limite di 10 ng/L previsto dalle linee guida dell'EMA. Tale assunto dimostra la validità delle indagini tossicologiche mediante approccio molecolare come strumento indispensabile per una corretta valutazione dei rischi legati alla presenza di composti dal meccanismo d'azione specifico in ambiente acquatico, anche ai fini della formulazione di farmaci dal minor impatto ecotossicologico. Tuttavia occorre precisare che le risposte a livello molecolare non sono state in grado di identificare chiare relazioni dose-dipendenti nella variazione dei parametri analizzati. Inoltre non chiariscono sufficientemente le ripercussioni che gli effetti osservati determinano a livello ecosistemico.

In conclusione, il presente lavoro di tesi ha fornito nuove conoscenze circa gli effetti cellulari/molecolari indotti da concentrazioni ambientali di fluoxetina nel mitilo mediterraneo. Inoltre ha fornito importanti approfondimenti inerenti la fisiologia del mitilo, correlati al meccanismo d'azione della serotonina. In entrambi i casi, tali contributi sono utilizzabili come base conoscitiva in vista di futuri approfondimenti, in ambito fisiologico ed ecologico

6. BIBLIOGRAFIA

- Ahrer W, Schöftner R, Buchberger W. 2001. Identification of unknown degradation products in a new cholesterol-reducing drug by ion-chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 912: 91-8.
- Albert PR, Sajedi N, Lemonde S, Ghahremani MH. 1999. Constitutive G(i2)-dependent activation of adenylyl cyclase type II by the 5-HT1A receptor –inhibition by anxiolytic partial agonists. *J Biol Chem*, 274: 35469-74.
- Angers A, Storozhuk MV, Duchaine T, Castellucci VF, Des Groseillers L. 1998. Cloning and functional expression of an Aplysia 5-HT receptor negatively coupled to adenylate cyclase. *J Neurosci*, 18: 5586-5593.
- Banni M, Negri A, Mignone F, Boussetta H, Viarengo A, Dondero F (2011) Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. *PLoS One*, 6: e18904.
- Bayne BL, Bubel A, Gabbott PA, Livingston DR, Lowe DM, Moore MN. 1982. Glycogen utilization and gametogenesis in *Mytilus edulis* L. *Mar Biol Lett*, 3:89–105.
- Bard SM, 2000. Multixenobiotic resistance as a cellular defence mechanism in aquatic organisms. *Aquat Toxicol*, 48: 357-389.
- Bardales JR, Diaz-Enrich MJ, Ibarguren I, Villamarín JA, 2004. Isoforms of cAMP-dependent protein kinase in the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*: activation by cyclic nucleotides and effect of temperature. *Arch Biochem Biophys*, 432: 71-78.
- Bardales JR, Díaz-Enrich M.J., Villamarín A., 2009. Differential distribution of cAMP-dependent protein kinase isoforms in the mantle of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *J Mol Histol*, 40: 251-259.
- Bardales JR, Hellman U, Villamarín JA. 2007. CK2-mediated phosphorylation of type II regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from the mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Biochem Biophys*, 461: 130-137.
- Bardales JR, Hellman U, Villamarín JA. 2008. Identification of multiple isoforms of the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit in the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *FEBS Journal*, 275: 4479-4489
- Bardales JR, Hellman U, Villamarín JA. 2011. Differential distribution of cAMP-dependent protein kinase isoforms in varioustissues of the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Acta Histochemica*, 113: 743– 748
- Barth E, Albuszies G, Baumgart K, Matejovic M, Wachter U, Vogt J, Radermacher P, Calzia E. 2007 Glucose metabolism and catecholamines. *Critical Care Medicine*. 35: 508-518
- Blanco SL, Suárez MP, San Juan F, 2006. Seasonal changes of nucleotides in mussel mantle tissue

(*Mytilus galloprovincialis*), *Comparative Biochemistry and Physiology*, 143: 384–390

Brooker RJ, Widmaier EP, Graham LE., Stiling PD. 2009. *Biologia Generale, Mac Graw Hill*, 181-182

Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD, Lewis RJ. 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ Toxicol. Chem*, 24: 464–469.

Brooks B W, Chambliss C K, Stanley J K, Ramirez A, Banks K E, Johnson RD, Lewis R J. 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent dominated stream. *Environ Toxicol Chem*, 24: 464-469.

Brown J N, Paxeus N, Forlin L, and Larsson D G J. (2007). Variations in bioconcentration of human pharmaceuticals from sewage effluents into fish blood plasma. *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 24: 267-274.

Buratti S, Franzellitti S, Poletti R, Ceredi A, Montanari G, Capuzzo A, Fabbri E. 2011. Bioaccumulation of algal toxins and changes in physiological parameters in Mediterranean mussels from the North Adriatic Sea (Italy). *Environ Toxicol*, 10.1002/tox.20739

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55:611-22.

Cao J, Ramos-Martinez JI, Villamarin JA. 1995a. Characterization of a cAMP-binding protein from the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem* 232:664–670.

Cao J, Fernandez M, Vazquez-Illanes MD, Ramos-Martinez JI, Villamarin JA. 1995b. Purification and characterization of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase from the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis*. *Comp Biochem Physiol*, 111:453–462.

Carson MJ, Thomas EA, Danielson PE, Sutcliffe JG. 1996. The 5-HT_{5A} serotonin receptor is expressed predominantly by astrocytes in which it inhibits cAMP accumulation: a mechanism for neuronal suppression of reactive astrocytes. *Glia*, 17: 317–26.

Catterson M L, Preskorn S H. 1996. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors: clinical relevance. *Pharmacol Toxicol*, 78: 203-208.

- Chen CJ, Chin JE, Ueda K, Clark DP, Pastan I, Gottesman MM, Roninson IB. 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell*, 47: 381–389.
- Chen L, Xie L, Dai Y, Xiong X, Fan W, Zhang R. 2004. Cloning and characterization of an mRNA encoding a novel G protein α -subunit abundant in mantle and gill of pearl oyster (*Pinctada fucata*). *Comp Biochem Physiol*, 139: 669-679.
- Chen L, Xie L, Xiong X, Dai Y, Fan W, Zhang R. 2005. Cloning and characterization of a novel G protein β -subunit of pearl oyster (*Pinctada fucata*), and its interaction sites with calmodulin. *Comp Biochem Physiol*, 142: 142-152.
- Chiou CT. 2002. Bioconcentration of organic contaminants, *Partition and Adsorption of Organic Contaminants in Environmental Systems*, pp. 257.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann. Biochem*, 162: 156-159.
- Christen V, Hickmann S, Rechenberg B, Fent K. 2010. Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: a concept for their identification based on their mode of action. *Aquat Toxicol*, 96: 167-181.
- Ciocan CM, Cubero-Leon E, Minier C, Rotchell JM. 2011. Identification of reproduction-specific genes associated with maturation and estrogen exposure in a marine bivalve *Mytilus edulis*. *PLoS One*, 6: e22326.
- Ciocan CM, Cubero-Leon E, Peck MR, Langston WJ, Pope N, Minier C, Rotchell JM. 2012. Intersex in *Scrobicularia plana*: transcriptomic analysis reveals novel genes involved in endocrine disruption. *Environ Sci Technol*, 46: 12936-42
- Cleuvers M, 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett*, 142: 185–194
- Collins S, Caron M G, Lefkowitz R J. 1992. From ligand binding to gene expression: new insights into the regulation of G-protein-coupled receptors. *Trends in Biochem Sci*, 17: 37–39
- Contardo-Jara V, Lorenz C, Pflugmacher S, Nützmann G, Kloas W, Wiegand C. 2011. Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissena polymorpha*. *Aquat Toxicol*, 105: 428-37.
- Couper, J.M., Leise, E.M., 1996. Serotonin injections induce metamorphosis in larvae of the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *Biol. Bull*, 191: 178-186.
- Cubero-Leon E, Ciocan CM, Hill EM. , Osada M, Kishida M, Itoh N, Kondob R, Minierd C, Rotchella JM. 2010. Estrogens disrupt serotonin receptor and cyclooxygenase mRNA expression in the gonads of mussels (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology*, 98: 178-187

- Cubero-Leon E, Ciocan CM, Minier C, Rotchell JM (2012) Reference gene selection for qPCR in mussel, *Mytilus edulis*, during gametogenesis and exogenous estrogen exposure. *Environ Sci Pollut Res In*, 19: 2728-33.
- Dailianis S, Piperakis SM, Kaloyianni M. 2005. Cadmium effects on ROS production and DNA damage via adrenergic receptors stimulation: role of Na⁺/H⁺ exchanger and PKC. *Free Radic Res*, 39:1059-1070.
- Dailianis S, Kaloyianni M. 2007. Role of cAMP in tissues of mussel *Mytilus galloprovincialis* as a potent biomarker of cadmium in marine environments. *Arch Environ Contam Toxicol*, 52: 371-378.
- Daughton C G, Brooks B W. 2011. Active Pharmaceutical Ingredients and Aquatic Organisms. *Environmental Contaminants in biota: Interpreting Tissue Concentrations*, 2nd ed.: 287-347
- DeLange HJ, Noordoven W, Murk AJ, Lurling M, Peeters ETHM. 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquat Toxicol*, 78: 209-216.
- De Leo G, Ginelli E, Fasano S. 2009. Biologia e genetica. *Ed. 2*, 675-677
- De Zwaan A, Mathieu M. 1992. Cellular biochemistry and endocrinology. In: E. Gosling (ed). The Mussel *Mytilus*: Ecology, Physiology, Genetics and Culture. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 25: 223-307
- Diaz-Enrich MJ, Ibarguren I. 2003. Implication of adenosine 30,50-cyclic monophosphate, guanosine 30,50-cyclic monophosphate, adenosine 50-mono-, di-, and triphosphate and fructose-2,6-bisphosphate in the regulation of the glycolytic pathway in relation to the gametogenic cycle in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Mol Cell Biochem*, 252: 339-345.
- Diaz-Enrich MJ, Ibarguren I, Hellman U, Villamarín JA. 2003. Characterization of a type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Biochem Biophys*, 416: 119-27.
- Dodge-Kafka KL, Kapiloff MS. 2006. The mAKAP signaling complex: Integration of cAMP, calcium, and MAP kinase signaling pathways. *Eur J Cell Biol*, 85: 593-602
- Dondero F, Piacentini L, Banni M, Rebelo M, Burlando B, Viarengo A. 2005. Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene*, 345: 259-270.
- Egan R J, Bergner C L, Hart P C, Cachat, J M, Canavello P R, Elegante M F, Elkhayat S I, Bartels B K, Tien A K, Tien, D H, Mohnot S, Beeson E, Glasgow E, Amri H, Zukowska

- Z, Kalueff A V. 2009. Understanding behavioural and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behav. Brain Res*, 205: 38-44.
- Eufemia NA, Epel D. 2000. Induction of the multixenobiotic defense mechanism (MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. *Aquat Toxicol*, 49: 89-100.
- European Medicines Agency (EMA). 2006. Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. *Committee for medicinal products for human use*, CHMP/SWP/4447/00 corr 1
- Fabbri E, Capuzzo A. 2006. Adenylyl cyclase activity and its modulation in the gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed Cr(6+) and Cu(2+). *Aquat Toxicol*, 76: 59-68.
- Fabbri E, Capuzzo A. 2010. Cyclic AMP signaling in bivalve molluscs: an overview. *J Exp Zool A*, 313:179-200
- Fent K. 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicol let*, 141: 356-365.
- Fent K, Weston AA, Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76: 22-159
- Fernández M, Cao J, Vázquez-Illanes MD, Ramos-Martínez JI, Villamarín JA. 1994. Phosphofructokinase from mantle tissue of *Mytilus galloprovincialis*: Purification and effects of phosphorylation on the enzymatic activity. *Biochem Mol Biol Int*, 33: 355-364
- Fernández M, Cao J, Vega FV, Hellman U, Wernstedt C, Villamarín JA. 1997. cAMP-dependent phosphorylation activates phosphofructokinase from mantle tissue of the mollusc *Mytilus galloprovincialis*: Identification of the phosphorylated site. *Biochem Mol Biol Int*, 43: 173-181,
- Fernandez M, Cao J, Villamarin JA. 1998. In vivo phosphorylation of phosphofructokinase from the bivalve mollusk *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Biochem Biophys*, 353:251–256.
- Ferrari B, Mons R, Vollat B, Frayse B, Paxéus N. Lo Guidice R, 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment. *Environ Toxicol Chem*, 23: 1344-1354.
- Fong PP, Wall DM, Ram JL. 1993. Characterization of serotonin receptors in the regulation of spawning in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *J Exp Zool*, 267: 475-482.

- Fong PP, 1998. Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Biol Bull*, 194: 143-149
- Fong PP, Kyojuka K, Abdelghani H, Hardege JD, Ram JL. 1994. In vivo and in vitro induction of germinal vesicle breakdown in a freshwater bivalve, the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *J Exp Zool*, 269: 467-74.
- Fong PP, Warner M. 1995. Serotonin-induced parturition in the fingernail clam *Sphaerium* (Musculium) *transversum* (Say). *J of Exp Zool*, 272: 163-166
- Fong PP, 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.
- Fong PP, Huminski PT, D'Urso LM. 1998. Induction and potentiation of parturition in fingernail clams (*Sphaerium striatinum*) by selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). *J Exp Zool*, 280: 260-264.
- Fong PP, Philbert CM, Roberts BJ. 2003. Putative serotonin reuptake inhibitor-induced spawning and parturition in freshwater bivalves is inhibited by mammalian 5-HT₂ receptor antagonists. *J Exp Zool*, 298:67-72.
- Foran CM, Weston J, Slattery M, Brooks BW, and Huggett DB. 2004. Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 46: 511-17.
- Franzellitti S, Fabbri E. 2006. Cytoprotective responses in the Mediterranean mussel exposed to Hg²⁺ and CH₃Hg⁺. *Biochem Biophys Res Commun*, 351:719-725.
- Franzellitti S, Buratti S, Valbonesi P, Capuzzo A, Fabbri E. 2011. The β -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 101: 299-308.
- Furlong ET, Kinney CA, Burkhardt MR, Zaugg SD, Werner SL. 2003. Organic wastewater contaminants in biosolids and biosolid-derived products. *Abstracts with Programs*, 35: pp 149.
- Fujioka J, 2002. Effects of hormone treatments and temperature on sex-reversal of *Nigorobuna Carassius* and *Carassius grandoculis*. *Fish Sci*, 68: 889-893.
- Gabbott PA. 1983. Development and seasonal metabolic activities in marine molluscs. In: P.W. Hochachka (ed). *The Mollusca*, 2: 165-217
- Gaddum JH, Picarelli ZP, 1957. Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol*, 12: 323-328

- Garnerot F, Pellerin J, Blaise C, Mathieu M. 2006. Immunohistochemical localization of serotonin (5-hydroxytryptamine) in the gonad and digestive gland of *Mya arenaria* (Mollusca: Bivalvia). *Gen. Comp. Endocrinol.* 149, 278–284.
- Garrison AW, Pope JD, Allen FR. 1976. Analysis of organic compounds in domestic wastewater. In: Keith, C.H. (Ed.), Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water. *Ann Arbor Sci*, 517–566.
- Gehring C. 2010. Adenylyl cyclases and cAMP in plant signaling – past and present; *Cell Communication and Signaling*, 8-15
- Gerhardt CC, Leysen JE, Planta RJ, Vreugdenhil E, Van Heerikhuizen H. 1996. Functional characterization of a 5-HT₂ receptor cDNA cloned from a *Lymnaea stagnalis*. *Eur J Pharmacol*, 311: 249-258
- Ghoneim OM, Ibrahim DA, El-Deeb IM, Lee SH, Booth RG. 2011. A novel potential therapeutic avenue for autism: design, synthesis and pharmacophore generation of SSRIs with dual action. *Bioorg Med Chem Lett*, 21: 6714-23
- Gibbons MC, Castagna M. 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture*, 40: 189-191.
- Gunnarsson L, Jauhiainen A, Kristiansson E, Nerman O, Larsson DGJ. 2008. Evolutionary conservation of human drug targets in organisms used for environmental risk assessments. *Environ Sci Technol*, 42:5807-5813.
- Gust M, Buronfosse T, Giamberini L, Ramil M, Mons R, Garric J. 2008. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. *Environ Pollut*, 2: 423-29
- Gust M, Buronfosse T, Giamberini J, Ramil M, Mons R, Garric J. 2009. Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. *Environ Pollut*, 157: 423-429.
- Hay-Schmidt A, 2000. The evolution of the serotonergic nervous system ' Proceedings of the Royal Society of London. *Biological Sciences*, 267: 1071-1079.
- Hannon JP, Hoyer D. 2008. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research*, 195: 198-213
- Hanumante MM, Butler TA, Fingerman M. 1984. Effect of 5-hydroxytryptamine antibodies on pigment migration in the erythrophores of the fiddler crab, *Uca pugilator*: further evidence for 5-hydroxytryptamine as a neurotransmitter that stimulates release of red pigment-dispersing hormone. *Experientia*, 40:740-1
- Heberer T. 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131: 5–17

- Henry TB, Kwon JW, Armbrust KL, Black MC. 2004. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ Toxicol Chem*, 23: 2229-33.
- Hiemke C, Hartter S. 2000. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol. Ther*, 85: 11-28.
- Hirsch R, Ternes TA, Haberer K, Mehlich A, Ballwanz F, Kratz KL. 1998. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr*. 815: 213-23
- Holm JV, Rugge K, Bjerg PL, Christensen TH. 1995. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the ground water down gradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Envi Sci and Tech*, 29: 1415-1420
- Hong H, Lu Y, Ji ZN, Liu GQ. 2006. Up-regulation of P-glycoprotein expression by glutathione depletion-induced oxidative stress in rat brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem*, 98: 1465-73.
- Honkoop PJC, Luttikhuisen PC, Piersma T. 1999. Experimentally extending the spawning season of a marine bivalve using temperature change and fluoxetine as synergistic triggers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 180: 297-300
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 71: 533-554
- Huggett DB, Brooks BW, Peterson B, Foran CM, Schlenk D. 2002. Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Arch Environ Contam Toxicol*, 43: 229-35.
- Jobling S, Casey D, Rodgers-Gray T, Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Pawlowski S, Baunbeck T, Turner A P, Tyler C R, (2003). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat Toxicol*, 65: 205-220
- Johnston JM, Wood DF, Read S., Johnston DG. 1993. Dopamine regulates D2 receptor gene expression in normal but not in tumorous rat pituitary cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 92: 63-68
- Khotimchenko YS, Deridovich II. 1989. The effect of dopamine and galoperidol on cyclic AMP in the gonad of the bivalve mollusk *Mizuhopecten yessoensis* and the sea urchin *Stroglyocentrotus intermedius*. *Comp Biochem Physiol*, 92: 23-26.
- Kohler G, Lindl T. 1980. Effects of 5-hydroxytryptamine, dopamine, and acetylcholine on accumulation of cAMP and cGMP in the anterior byssus retractor muscle of *Mytilus edulis* L. (Mollusca). *Pflugers Arch*, 383:257-262.
- Koch S, Perry K W, Nelson D L, Conway, R G, Threlkeld P G, Bymaster F P. 2002. R-fluoxetine increases extracellular DA, NE, as well as 5-HT in rat prefrontal cortex and

- hypothalamus: An in vivo microdialysis and receptor binding study. *Neuropsychopharmacology*, 27:949-59.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams. *Environ Sci Technol*, 36: 1202-1211
- Kreke N, Dietrich DR. 2008. Physiological endpoints for potential SSRI interactions in fish. *Crit Rev Toxicol*, 38: 215-47
- Kulkarni GK, Fingerman M. 1992a. Effects of 5-hydroxytryptamine antagonists on ovarian development in the fiddler crab, *Uca pugnator*. *Comp Biochem Physiol*, 101: 419-423.
- Kulkarni GK, Fingerman M. 1992b. Quantitative Analysis by Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography of 5-Hydroxytryptamine in the Central Nervous System of the Red Swamp Crayfish, *Procambarus clarkia*. *Biol. Bull*, 182: 341-347
- Kümmerer K. 2003. Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrob Chemother*, 52: 5-7.
- Kwon JW, Armbrust K L. 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environ Toxicol Chem*, 25: 2561-8.
- Lange R, Hutchinson TH, Croudace CP, Siegmund F. 2001. Effects of the synthetic estrogen 17 alpha-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem*, 20: 1216-1227.
- Lenahan PF, Gutiérrez PL, Wagner JL, Milak N, Fisher GR, Ross DD. 1995. Resistance to oxidants associated with elevated catalase activity in HL-60 leukemia cells that overexpress multidrug-resistance protein does not contribute to the resistance to daunorubicin manifested by these cells. *Cancer Chemother Pharmacol*, 35: 377-86.
- Li XC, Giot JF, Kuhl D, Hen R, Kandel ER. 1995. Cloning and characterization of two related serotonergic receptors from the brain and the reproductive system of *Aplysia* that activate phospholipase. *C J Neurosci*, 15: 7585-91
- Linder JU, Schultz JE. 2003. The class III adenylyl cyclases: multipurpose signaling modules. *Cell Sign*, 15:1081-1089.
- Livak and Schmittgen, 2008 Livak KJ, Schmittgen TD. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3: 1101-08.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol Chem* 193: 265-275
- Lu D, Shi HC, Wang ZX, Gu XW, Zeng YJ. 2011. Multidrug resistance-associated biomarkers PGP, GST-pi, Topo-II and LRP as prognostic factors in primary ovarian carcinoma. *Br J Biomed Sci*, 68: 69-74.

- Lubet P. 1957. Cycle sexuel de *Mytilus edulis* L. et de *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Année Biol*, 33:19-29.
- Luedeking A, Koehler A. 2004. Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicology*, 69: 1-10
- Lumms SC. 2004. The transmembrane domain of the 5-HT₃ receptor: its role in selectivity and gating. *Biochem Soc Trans*, 32: 535-9.
- Lynn S E, Egar J M, Walker B G, Sperry T S, Ramenofsky M. 2007. Fish on Prozac: a simple, noninvasive physiology laboratory investigating the mechanisms of aggressive behavior in *Betta splendens*. *Adv. Physiol. Educ*, 31: 358-63.
- Mancebo MJ, Treviño M, Espinosa J. 1991. Adenylate cyclase activity in *Mytilus galloprovincialis* Lmk: Characteristics of the enzyme from mantle tissue. *J Exp Zool*, 258: 174-180,
- Mancebo MJ, Treviño M, Espinosa J. 1992. Pattern of the mantle adenylate cyclase activity during the reproductive cycle of the females *Mytilus galloprovincialis*. *Gen Comp Endocrinol*, 86: 184-188
- Markstein R, Matsumoto M, Kohler C, Togashi H, Yoshioka M, Hoyer D. 1999. Pharmacological characterisation of 5-HT receptors positively coupled to adenyl cyclase in the rat hippocampus. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 359: 454-59.
- Martin-Diaz L, Franzellitti S, Buratti S, Valbonesi P, Capuzzo A, Fabbri E. 2009. Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*, 94: 177–185.
- Matsutani T, Nomura T. 1986. Pharmacological observations on the mechanism of spawning in the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 52:1589–1594.
- Maya Vetencourt J F, Sale A, Viegi A, Baroncelli L, De Pasquale R, O’Leary O F, Castrén E, Maffei L. 2008. The Antidepressant Fluoxetine Restores Plasticity in the Adult Visual Cortex. *Science*, 320: 385-388
- Mennigen JA, Crump K, Xiong H, Zhao E, Popesku P, Anisman H, Xia X, Trudeau VL. 2008. The effects of fluoxetine on the reproductive axis of female goldfish (*Carrasius auratus*). *Physiol Genom* 35: 273–82.
- Mennigen JA, Stroud P, Zamora JM, Moon TW, Trudeau VL. 2011. Pharmaceuticals as neuroendocrine disruptors: lessons learned from fish on Prozac. *J Toxicol Environ Health B*, 14: 387-412

- Metcalfe CD, Koenig BG, Bennie DT, Servos M, Ternes TA, Hirsch R. 2003. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2872–2880.
- Metcalfe CD, Beddows PA, Bouchot GG, Metcalfe TL, Li H, Van Lavieren H. 2011. Contaminants in the coastal karst aquifer system along the Caribbean coast of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Environ Pollut*, 159: 991-7
- Minier C, Borghi V, Moore MN, Porte C. 2000. Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol*, 50: 167-176.
- Minier C, Abarnou A, Jaouen-Madoulet A, Le Guellec AM, Tutundjian R, Bocquene´ G, Leboulenger F. 2006. A pollution monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environ. Toxicol. Chem*, 25: 112-119.
- Mosenden R; Tasken, K.Cyclic. 2011. AMP-mediated immune regulation - Overview of mechanisms of action in T cells. *Cellular Signalling*, 23: 1009-16
- Nakamura Y, Yamamoto H, Sekizawa J, Kondo T, Hirai N, Tatarazako N. 2008. The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere*, 70: 865-73.
- Ono JK, Hampton JD, Koch RA. 1992. Immunohistochemical localization and radioenzymatic measurements of serotonin (5-hydroxytryptamine) in hearts of *Aplysia* and several bivalve mollusks. *Cell Tissue Res*, 269: 421-430.
- Osanai K, 1985. In vitro induction of germinal vesicle breakdown in oyster oocytes. *Bull Mar Biol*, 18: 1-9.
- Osadaa M, Matsutania T , Nomuraa T. 1987. Implication of Catecholamines During Spawning in Marine Bivalve Molluscs, *Int Jour of Inv Repr and Dev*, 12: 241-251
- Panksepp J B, Yue Z, Drerup C, Huber R. 2003. Amine Neurochemistry and Aggression in Crayfish. *Microscopy Research and Technique*, 60: 360–368
- Paterson G, Metcalfe CD. 2008. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 74: 125-30.
- Perreault HAN, Semsar K, Godwin J. 2003. Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish. *Physiology and Behavior*, 79: 719-724
- Pertseva MN, Shpakov AO, Plesneva SA, Kuznetsova LA. 2003. A novel view on the mechanisms of action of insulin and other insulin superfamily peptides: involvement of adenylyl cyclase signaling system. *Comp Biochem Physiol*, 134: 11–36.

- Pérya ARR, Gusta M, Vollata B, Monsa R, Ramilc M, Finkc G, Ternesc T, Garrica J. 2008. Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates, *Chemosphere*, 73: 300–304
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30: e36
- Popinako AV, Levtsova OV, Antonov MY, Nikolaev IN, Shaitan KV. 2011. The Structural and Dynamic Model of the Serotonin 5HT₃ Receptor. Comparative Analysis of the Structure of the Channel Domain of Pentameric Ligand Gated Ion Channels. *Biophysics*, 56: 1078-1082
- Price GW, Roberts C, Watson J, Burton M, Mulholland K, Middlemiss DN, Jones BJ. 1996. Species differences in 5-HT autoreceptors. *Behav Brain Res*, 73: 79-82
- Raftopoulou EK, Dailianis S, Dimitriadis VK, Kaloyianni M. 2006. Introduction of cAMP and establishment of neutral lipids alterations as pollution biomarkers using the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Correlation with a battery of biomarkers. *Sci Total Environ*, 368: 597–614
- Ram JL, Moore D, Putschakayala S, Paredes AA, Ma D, Croll RP. 1999. Serotonergic responses of the siphons and adjacent mantle tissue of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Comp Biochem Physiol*, 124: 211–220.
- Richardson ML, Bowron JM. 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J. Pharm. Pharmacol.* 37: 1–12.
- Roberts C, Price G W, Middlemiss D N. 2001. Ligands for the investigation of 5-HT autoreceptor function *Brain Research Bulletin*, 56: 463-469
- Roberts PH, Thomas KV. 2005. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment. *Sci. Total Environ*, 356: 143-53
- Rodriguez JL, Barcia R, Ramos-Martinez JJ, Villamarín JA. 1998. Purification of a novel isoform of the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from the bivalve mollusk. *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Biochem Biophys*, 359: 57-62
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. 1659 p.
- Sanchez-Arguello P, Fernández C, Tarazona JV. 2009. Assessing the effects of fluoxetine on *Physa acuta* (Gastropoda, Pulmonata) and *Chironomus riparius* (Insecta, Diptera) using a two-species water-sediment test. *Sci Total Environ*, 407: 1937-1946

- Sanjuan-Serrano F, Fernandez-Gonzalez M, Sanchez-Lopez JL, Garcia-Martin LO. 1995. Molecular mechanism of the control of glycogenolysis by calcium ions and cyclic AMP in the mantle of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Comp Biochem Physiol*, 110: 577–582.
- Sanderson MJ, Dirksen ER, Satir P. 1985. The antagonistic effect of 5-hydroxytryptamine and methylxanthine on the gill cilia of *Mytilus edulis*. *Cell Motil*, 5:293-309
- Sauna Z E, Ambudkar S V. 2007. About a switch: how P-glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work. *Mol Cancer Ther*, 6: 13-23
- Scheide JJ, Dietz TH. 1986. Serotonin regulation of gill cAMP production, Na and water uptake in freshwater mussels. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*, 240: 309–314.
- Schmitt H, Boucard T, Garric J, Jensen J, Parrott J, Péry A, Römbke J, Straub JO, Hutchinson TH, Sánchez-Argüello P, Wennmalm A, Duis K. 2009. Recommendations on the environmental risk assessment of pharmaceuticals: Effect characterization. *Integr Environ Assess Manag*, 6: 588-602.
- Seiler P. 2002. Pharmacodynamic activity of drugs and ecotoxicology - can the two be connected? *Toxicology Letters*, 131:105-115
- Sieglman MJ, Funabara D, Kinoshita S, Watabe S, Hartshorne DJ, Butler TM. 1998. Phosphorylation of a twitchin-related protein controls catch and calcium sensitivity of force production in invertebrate smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci*, 95:5383–5388
- Skalhegg BS, Tasken K. 1997 Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci*, 5: 678-93.
- Sarojini R, Reddy PS, Nagabhushanam R, Fingerman M. 1993. Naphthalene-induced cytotoxicity on the hepatopancreatic cells of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 51: 689-95.
- Stan H J, Hebercr T, Linkerh-igner M, (1994) Occurrence of Clofibrilic Acid in the Aquatic System - Is the Use in Human Medical Care the Source of the Contamination of Surface, Ground and Drinking Water ? *Vom Wasser*, 83: 57-68.
- Sugamori KS, Sunahara RX, Guan,HC. Bulloch AG, Tensen CP, Seeman P, Niznik HB, Van Tol HH. 1993. Serotonin receptor cDNY, cloned from *Lymnae stagnalis*. *Proc Natl Acad Sci*, 90: 11-15
- Ternes T, Bonerz M, Schmidt T. 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 938: 175-85.

- Tesmer JJ, Sprang SR. 1998. The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase. *Curr Opin Struct Biol*, 8: 713-9
- Thaker PD. 2005. Pharmaceutical data elude researchers. *Environ Sci Technol*, 39: 193–194
- Tierney AJ. 2001. Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comp Biochem and Phys*, 128: 791-804
- Trewhella J. 2006. Protein kinase A targeting and activation as seen by small-angle solution scattering. *Eur J Cell Biol*, 85: 655-662
- Tutundjiana R, Minier C. 2007. Effect of temperature on the expression of P-glycoprotein in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *J. of Thermal Biol*, 32: 171-177
- Uhler GC, Huminski PT, Les FT, Fong PP (2000) Cilia-driven rotational behavior in gastropod (*Physa elliptica*) embryos induced by serotonin and putative serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *J Exp Zool*, 286:414-421
- Van Harten J. 1993. Clinical pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Clin Pharmacokinet*, 24: 203-220.
- Vanderford BJ, Snyder SA. 2006. Analysis of pharmaceuticals in water by isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol*, 40: 7312-20
- Van der Ven K, Van Dongen W, Maes BUW, Esmans EL, Blust R, De Coen WM. 2004. Determination of diazepam in aquatic samples by capillary liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Chemosphere*, 57: 967–973.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3: Res 0034.
- Vazquez-Illanes MD, Ramos-Martinez JJ. 1991. Phosphorylation- activated 6-phosphofructo-2-kinase from mantle tissue of marine mussels, *FEBS Lett*. 295: 176-178.
- Villalba A. 1995. Gametogenic cycle of cultured mussel, *Mytilus galloprovincialis*, in the bays of Galicia (N.W. Spain). *Aquaculture* 130: 269-277
- Yamamoto H, Hayashi A, Nakamura Y, Sekizawa J. 2005. Fate and partitioning of selected pharmaceuticals in aquatic environment. *Environ Sci*, 12: 347-58
- Yamada A, Yioshio M, Nakamura A, Kohama K, Oiwa K. 2004. Protein phosphatase 2B dephosphorylates twitchin, initiating the “catch” state of invertebrate smooth muscle. *J Biol Chem*, 279: 40762-68.

- Yi JH, Lefievre L, Gagnon C, Anctil M, Dube F. 2002. Increase of cAMP upon release from prophase arrest in surf clam oocytes. *J Cell Sci*, 115:311-320.
- Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. 1968. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*, 243: 3763-3765.
- Weston JJ, Huggett DB, Rimoldi J, Foran CM, Stattery M. 2001. Determination of fluoxetine (ProzacTM) and norfluoxetine in the aquatic environment. *Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Baltimore, MD*.
- Webb SF. 2001. A data based perspective on the environmental risk assessment of human pharmaceuticals II: aquatic risk characterisation. *Pharmaceuticals in the Environment. Sources, Fate, Effects and Risks*, 319–343.
- Zhang G, Liu Y, Ruoho AE, and Hurley JH. 1997. Structure of the adenylyl cyclase catalytic core. *Nature* 386: 2477-253

7. RINGRAZIAMENTI

Quella appena conclusa è stata in assoluta l'esperienza di studio più impegnativa ma allo stesso tempo interessante che abbia mai vissuto. Pertanto desidero ringraziare tutti coloro che hanno reso possibile questo mio percorso.

In particolare i miei ringraziamenti vanno alla Professoressa Elena Fabbri, per aver permesso che trattassi quelli che ritengo siano i temi scientifici più affascinanti e stimolanti di cui potessi occuparmi, ma soprattutto per la professionalità e competenza con la quale mi ha guidato nell'elaborazione della tesi, nonostante i suoi mille impegni.

Un dovuto, ma sentito, ringraziamento lo rivolgo a Silvia, per l'immensa pazienza dimostrata nel chiarire ogni mio dubbio più strampalato, per essere stata disponibile ad assecondare alcune mie iniziative e per aver stimolato i miei interessi verso questa scienza attraverso la sua indiscutibile professionalità.

Desidero inoltre ringraziare Sara per le costanti parole di conforto e incitamento con le quali mi ha tirato su nei miei frequenti "stati confusionali". Aver avuto una figura di supporto come sei stata tu all'interno del laboratorio sarà una delle cose che ricorderò con maggior piacere di quest'esperienza.

Come avevo già deciso non mi dilungherò nel ringraziare uno ad uno gli amici che mi sono stati accanto e con cui ho condiviso i momenti più importanti trascorsi qui a Ravenna. Quello che è giusto scrivere ritengo sia che in due, quasi tre anni di vita universitaria ho avuto la possibilità di conoscere persone meravigliose e amici leali che ho riconosciuto a tutti gli effetti come una seconda famiglia. Per cui non vi sto ringraziando dell'aiuto che mi avete dato nel percorso che sta per concludersi, ma semplicemente per ciò che rappresentate per me.

Ma il più sentito ringraziamento non può che andare ai miei genitori. Senza di loro non sarei sicuramente la persona che sono, e a dirla tutta, non ritengo che abbiano fatto un lavoro così disastroso. So che sapete perfettamente che l'impegno che metto in ciò che faccio è frutto dei vostri insegnamenti e da parte mia l'ho sempre considerato un atto di riconoscenza per quanto avete fatto e farete per me, ed è per questo che cercherò di non deludervi mai.