

ALMA MATER STUDIORUM UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

FACOLTÀ DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

**Effetto dei modulatori del sistema serotoninergico
sulla trasduzione del segnale AMPc-dipendente nel
mitilo**

Relatore:
Prof.ssa Elena Fabbri

Presentata da:
Ilaria Tosarelli

Correlatore:
Dott.ssa Silvia Franzellitti

II SESSIONE

Anno Accademico 2010/2011

SOMMARIO

SOMMARIO	1
ABSTRACT	3
1.SCOPO DELLA TESI	5
2.INTRODUZIONE	9
<u>2.1</u> La contaminazione ambientale da residui di farmaci	11
<u>2.2</u> L'uso dei farmaci	12
<u>2.3</u> La provenienza dei farmaci in ambiente	12
<u>2.4</u> Il destino dei farmaci nell'ambiente	13
<u>2.5</u> Le concentrazioni ambientali	14
<u>2.6</u> Gli effetti ecotossicologici	14
2.6.1 Concentrazioni ambientali di fluoxetina	17
2.6.2 Concentrazioni ambientali di propranololo	17
<u>2.7</u> Meccanismi d'azione ed effetti di propranololo e fluoxetina	18
2.7.1 Propranololo	18
2.7.2 Fluoxetina	18
<u>2.8</u> Il ruolo dei recettori adrenergici e serotoninergici nella comunicazione cellulare	19
2.8.1 Le tre tappe della comunicazione chimica	20
2.8.2 Recettori accoppiati a proteine G	20
2.8.3 Recettori adrenergici	22
2.8.4 Recettori serotoninergici	22
<u>2.9</u> La via di trasduzione del segnale AMPc-dipendente	25
<u>2.10</u> Il complesso dell'adenilil ciclasi nei mammiferi	26
2.10.1 La proteina G	26
2.10.2 La PKA nei mammiferi	28
<u>2.11</u> La trasduzione AMPc-dipendente nei bivalvi	28
2.11.1 Il sistema AC-AMPc	28

2.11.2 La PKA	29
<u>2.12</u> La P-glicoproteina e la Multi xenobiotic Resistance	30
3.MATERIALI E METODI	33
<u>3.1</u> Il mitilo Mediterraneo(<i>Mytilus galloprovincialis</i>)	35
3.1.1 Animali utilizzati per l'esperimento	37
<u>3.2</u> Esposizione <i>in vivo</i> dei mitili al trattamento di farmaci	37
<u>3.3</u> Preparazione degli emociti per gli esperimenti <i>in vitro</i> e trattamenti sperimentali	38
<u>3.4</u> Valutazione di alterazioni di parametri correlati alla trasduzione del segnale intracellulare	38
3.4.1 Livelli di AMP ciclico (AMPC)	38
3.4.2 Attività della protein chinasi AMP-dipendente (PKA)	39
<u>3.5</u> Analisi dell'espressione del gene ABCB1 mediante PCR semi-quantitativa Real time	40
3.5.1 Estrazione dell'RNA	40
3.5.2 Retrotrascrizione	41
3.5.3 La PCR real-time	41
<u>3.6</u> Analisi statistica	45
4.RISULTATI	47
<u>4.1</u> Effetti dell'esposizione <i>in vivo</i> dei mitili alla fluoxetina , al propranololo e alla loro miscela	49
4.1.1 Variazione dei livelli di AMP ciclico (AMPC)	49
4.1.2 Attività della Protein chinasi A (PKA)	50
4.1.3 Espressione del gene ABCB1 codificante per la P-glicoproteina (Pgp)	52
4.1.4 Analisi delle componenti principali	54
<u>4.2</u> Effetti dell'esposizione <i>in vitro</i> di emociti di mitilo a serotonina e propranololo	56
<u>4.3</u> Effetti dell'esposizione <i>in vitro</i> di emociti di mitilo ad attivatori e inibitori dell'attività della PKA	58
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	61
6.BIBLIOGRAFIA	71

ABSTRACT

Lo sviluppo della medicina ha determinato un utilizzo sempre crescente di sostanze farmacologiche, le quali una volta escrete dagli organismi raggiungono le acque dei fiumi e dei laghi, per arrivare poi all'ambiente marino costiero, che ne risulta sempre maggiormente contaminato. Negli organismi non bersaglio esposti ai residui dei farmaci in ambiente, queste sostanze potrebbero indurre effetti simili a quelli specifici nel caso i bersagli molecolari siano stati conservati durante l'evoluzione, oppure avere effetti inattesi se i bersagli molecolari sono conservati ma hanno una differente funzione. Questo lavoro di tesi è volto a studiare i potenziali effetti indotti dalla fluoxetina (FX, farmaco antidepressivo inibitore dell'uptake della serotonina), e dal propranololo (PROP, farmaco bloccante sia dei recettori β -adrenergici che serotoninergici nell'uomo) nei mitili *Mytilus galloprovincialis*, esposti a tali sostanze, valutandone l'interazione con i meccanismi di trasduzione del segnale AMPc-dipendente. Sono stati valutati in particolare i livelli di AMPc e l'attività dell'enzima PKA, inoltre si è studiato se i farmaci influiscano con i meccanismi di regolazione del gene ABCB1, che codifica per la P-glicoproteina (Pgp), che ha il compito di estrudere all'esterno della cellula gli xenobiotici che vi sono entrati. Gli studi sono stati condotti dopo esposizione dei mitili in vivo ai due farmaci ed alla loro miscela per 7 giorni in acquario. I risultati hanno indicato che la FX causa una diminuzione statisticamente significativa dei livelli di AMPc, dell'attività della PKA e anche dell'espressione del gene ABCB1 rispetto al controllo, sia nel mantello che nella ghiandola digestiva. Nella ghiandola digestiva il PROP provoca una significativa riduzione dei livelli di AMPc, dell'attività della PKA e dell'espressione del gene ABCB1 rispetto ai valori di controllo. Nel mantello, invece, il PROP aumenta i livelli di AMPc e l'espressione del gene ABCB1, anche se non ha effetti significativi sull'attività della PKA. Per caratterizzare i recettori per la serotonina (5HT), e il possibile ruolo di antagonista giocato dal PROP, abbiamo inoltre trattato in vitro emociti di mitilo con la 5HT l'agonista fisiologico del recettore, usata da sola ed in presenza del PROP. I dati ottenuti dimostrano che negli emociti di mitilo sono espressi recettori 5HT₁ accoppiati a proteine G inibitrici, e che il PROP blocca l'effetto della 5HT, agendo come antagonista dei recettori 5HT₁. Nell'insieme i dati dimostrano che i farmaci possono avere effetti sugli organismi acquatici anche a concentrazioni molto basse come quelle ambientali. I dati della tesi non dimostrano che PROP e FX hanno effetti deleteri sulle popolazioni o le comunità dei molluschi, ma debbono essere considerati come indicatori della vulnerabilità degli animali a questi composti. Si è dimostrato per la prima volta che gli emociti di mitilo possiedono recettori di tipo 5HT₁ correlati alla riduzione dei livelli intracellulari di AMPc, e soprattutto che il sistema AMPc/PKA è deputato alla regolazione dell'espressione dei geni ABCB1 codificanti per proteine del complesso Multi Xenobiotic Resistance.

1. SCOPO DELLA TESI

Lo sviluppo della medicina, sia umana che veterinaria, ha determinato un utilizzo sempre crescente di sostanze farmacologiche, le quali una volta escrete dagli organismi raggiungono le acque dei fiumi e dei laghi, per arrivare poi all'ambiente marino costiero, che ne risulta sempre maggiormente contaminato. Gli animali sono in grado di reagire alla presenza di xenobiotici nelle acque sviluppando risposte protettive; tuttavia gli effetti di questi composti possono anche compromettere importanti funzioni fisiologiche degli animali esposti, inerenti ad esempio i meccanismi di riproduzione, le regolazioni ormonali, o i meccanismi di difesa stessi.

I farmaci sono composti disegnati per avere effetti terapeutici ai fini medici o veterinari attraverso specifici meccanismi d'azione. Negli organismi non bersaglio che risultano esposti ai residui dei farmaci in ambiente, queste sostanze potrebbero indurre effetti simili a quelli specifici nel caso i bersagli molecolari siano stati conservati durante l'evoluzione, oppure avere effetti inattesi se i bersagli molecolari sono conservati ma hanno una differente funzione. Inoltre, i farmaci manifestano effetti collaterali, se usati a dosi elevate o per lungo tempo, e anche questi effetti possono aver luogo nella fauna acquatica.

Questo lavoro di Tesi, che segue precedenti studi condotti nei laboratori di Biochimica e Fisiologia Ambientale presso il CIRSA di Ravenna, in parallelo con un altro lavoro di tesi volto a studiare i possibili effetti collaterali degli stessi farmaci, ha voluto valutare nei mitili *Mytilus galloprovincialis* i potenziali effetti indotti dalla fluoxetina (farmaco antidepressivo), dal propranololo (farmaco β -bloccante), o dalla loro miscela dopo interazione con i recettori specifici e attraverso i meccanismi d'azione con cui svolgono l'azione terapeutica. Il propranololo agisce come bloccante dei recettori β -adrenergici e serotoninergici (Franzellitti *et al.*, 2011), mentre la fluoxetina agisce come inibitore dell'uptake della serotonina a livello delle terminazioni nervose con il risultato di stimolare più a lungo i recettori serotoninergici. Inoltre è stato valutato l'effetto della miscela delle due sostanze, considerando che i farmaci in ambiente sono sempre in combinazione con altri farmaci o altri contaminanti. Data la convergenza sul medesimo meccanismo di traduzione del segnale intracellulare, si può ipotizzare una interazione di fluoxetina e propranololo.

Abbiamo studiato pertanto l'effetto di propranololo e fluoxetina sulla trasduzione del segnale AMPc-dipendente, valutando nei tessuti dei mitili esposti in vivo ai due farmaci i livelli di AMPc e l'attività della PKA. L'AMPc è uno dei secondi messaggeri intracellulari più importanti, ed ha il compito di trasmettere ed amplificare il segnale chimico extracellulare all'interno della cellula, mediante l'attivazione del suo substrato fisiologico, l'enzima proteina chinasi A (PKA). Inoltre, si è valutato se i farmaci possono influire sui meccanismi di regolazione del gene ABCB1. Il gene

ABCB1 codifica per una proteina di trasporto della famiglia delle MXR (Multi Xenobiotic Resistance) situata sulla membrana cellulare e chiamata P-glicoproteina (Pgp), che ha il compito di estrudere all'esterno della cellula gli xenobiotici che vi sono entrati. Questa famiglia di proteine è presente negli invertebrati, ma è ben più nota nell'uomo (chiamata in questo caso MDR, Multi Drug Resistance) dove è particolarmente espressa nelle cellule tumorali conferendo la resistenza ai chemioterapici. Nei mammiferi sono stati ampiamente studiati anche i meccanismi di regolazione di questi trasportatori, ed in particolare è stata dimostrata l'influenza del sistema AMPc -dipendente sull'espressione genica di Pgp.

Una parte importante dello studio è stata indirizzata a comprendere il meccanismo d'azione dei due farmaci nelle cellule di mitilo, in particolare quello della serotonina, la cui concentrazione nelle fessure sinaptiche aumenta dopo trattamento con fluoxetina. In questo caso gli esperimenti sono stati condotti sugli emociti dei mitili, come cellule modello isolate e quindi molto utili per la comprensione di meccanismi complessi. Si è studiata in particolare l'interazione con il sistema AMPc-dipendente e l'espressione del gene ABCB1 in presenza di attivatori ed inibitori specifici del pathway di traduzione.

2. INTRODUZIONE

2.1 LA CONTAMINAZIONE AMBIENTALE DA RESIDUI DI FARMACI

I residui dei farmaci utilizzati nella medicina umana e veterinaria sono una classe emergente di contaminanti ambientali. L'utilizzo dei farmaci è molto elevato ed in continuo aumento, ma essi vengono assorbiti dall'organismo solo in parte; il rimanente viene escreto e confluisce nelle acque di scarico attraverso cui viene portato ai sistemi di depurazione. E' stato chiaramente osservato che molti farmaci non sono trattiene dai depuratori, o lo sono soltanto in parte. Negli anni recenti, molti studi sono stati rivolti all'analisi dei residui dei farmaci nell'ambiente, anche con l'applicazione di tecniche di analisi capaci d'identificare composti polari anche a basse concentrazioni. Un'importante tecnica è la cromatografia liquida utilizzata per separare i composti, accoppiata allo spettrofotometro di massa che identifica gli inquinanti polari organici (*Fent et al.*, 2006; *Kolpin et al.*, 2002). Questa tecnologia ha permesso di svolgere in diversi paesi dei monitoraggi ambientali dimostrando che i residui dei farmaci sono largamente diffusi nelle acque reflue trattate e in quelle superficiali (*Fent et al.*, 2006). Vi sono ancora pochi studi sulle acque costiere; dato il fattore di diluizione si è pensato per molto tempo che i farmaci non interessassero queste zone. Considerando però che molti farmaci sfuggono al controllo dei depuratori e molte zone costiere nel mondo ricevono acque non depurate, il problema esiste e deve essere tenuto in considerazione. Infatti residui di farmaci sono presenti anche nelle acque marino costiere (*Roberts e Thomas*, 2006; *Thomas e Hilton*, 2004; *Thomas e Langford*, 2007) a concentrazioni di rilievo. Per esempio gli antibiotici nella baia di Hong Kong raggiungono concentrazioni di centinaia di ng/L o addirittura di µg/L (*Minh et al.*, 2009).

Pur essendo note da tempo le concentrazioni ambientali, il potenziale effetto che i residui dei farmaci possono avere sulla fauna e flora acquatica è stato studiato molto più recentemente (*Fent et al.*, 2006). Gli organismi acquatici sono particolarmente indicati a rilevare la presenza dei farmaci poiché spesso sono esposti ad acque reflue per tutta la loro vita. Sono stati eseguiti numerosi studi sulla tossicità acuta dei farmaci, utilizzando test ecotossicologici standard per valutare la morte, la riproduzione o l'accrescimento di microalghe o crostacei (*Fent et al.*, 2006). Questi test hanno concluso che alle concentrazioni ambientali (mediamente comprese tra 10 e 1000 nM) i farmaci non rappresentano un rischio per l'ecosistema (*Fent*, 2003). Tuttavia, vi sono importanti evidenze del fatto che alcuni farmaci ambientali hanno avuto gravi effetti sulla fauna acquatica, ne sono un esempio i significativi fenomeni di femminilizzazione di pesci e di rettili dovuti all'etinilestradiolo (*Santos et al.*, 2010). In ragione di questo, studi più recenti (*Franzellitti et al.*, 2011; *Contardo-Jara et al.*, 2011) hanno indicato la necessità di tener conto che i farmaci sono molecole disegnate per essere biologicamente attive a basse dosi attraverso l'interazione con specifici bersagli. Quindi per

valutare correttamente se l'esposizione ai residui dei farmaci sia un rischio per l'ecosistema, occorre valutare gli effetti cronici dei farmaci sulle specie acquatiche; inoltre, una strategia rilevante è quella di considerare il meccanismo d'azione con cui i farmaci svolgono l'effetto terapeutico e studiare la possibilità che essi interferiscano, in maniera non voluta, con lo stesso meccanismo negli organismi acquatici.

Attraverso questi approcci, si cerca di arrivare alla definizione di linee guida mirate per limitare gli effetti indesiderati dei farmaci; non avendo ancora raggiunto questo obiettivo i farmaci vengono definiti contaminanti "emergenti", per i quali appunto non vi sono sufficienti dati per definire normative adeguate.

2.2 L'USO DEI FARMACI

Nell'Unione Europea circa 3000 differenti sostanze sono utilizzate nella medicina umana come analgesici e anti-infiammatori, contraccettivi, antibiotici, beta-bloccanti, regolatori lipidici, composti neuro-attivi e molti altri. Un largo numero di farmaci è ampiamente adibito all'uso veterinario come antibiotici e anti-infiammatori (*Fent et al.*, 2006). In Inghilterra, Germania e Australia le quantità di farmaci più utilizzati si aggirano intorno alle diverse tonnellate annue (*Jones et al.*, 2002; *Huschek et al.*, 2004; *Khan e Ongerth*, 2004). Il consumo dei farmaci nei diversi paesi non è identico e la vendita di alcuni di questi può essere vietata o sostituita da altri prodotti simili. Comunque le classi di farmaci più ampiamente utilizzate sono ampiamente documentate e si ritrovano tutte in ambiente (*Fent et al.*, 2006; *Nikolaou et al.*, 2007).

2.3 LA PROVENIENZA DEI FARMACI IN AMBIENTE

I farmaci dopo l'applicazione sono escreti nella loro forma nativa o come cataboliti ed entrano nel sistema acquatico attraverso vie differenti. La principale fonte d'immissione di questi nell'ambiente avviene tramite l'escrezione umana e lo smaltimento dei liquami domestici e ospedalieri, a seguito del loro vasto impiego in ambito della cura delle malattie umane. Un'altra fonte di emissione è data dallo smaltimento dei liquami derivati dagli allevamenti e dagli efflussi d'impianti di acquacoltura, dove vi è un ampio impiego di farmaci veterinari. Questi impianti di depurazione non degradano completamente i farmaci e quindi finiscono per contaminare fiumi, laghi, estuari e raramente, acque sotterranee e a volte anche l'acqua che beviamo. Altre forme d'inquinamento possono avvenire attraverso l'utilizzo dei fanghi di depurazione in agricoltura per il recupero dei nutrienti inorganici, lo spargimento dei reflui degli allevamenti sui terreni coltivati, discariche percolanti e lo smaltimento abusivo dei medicinali non utilizzati nell'ambiente (*Fent et al.*, 2006).

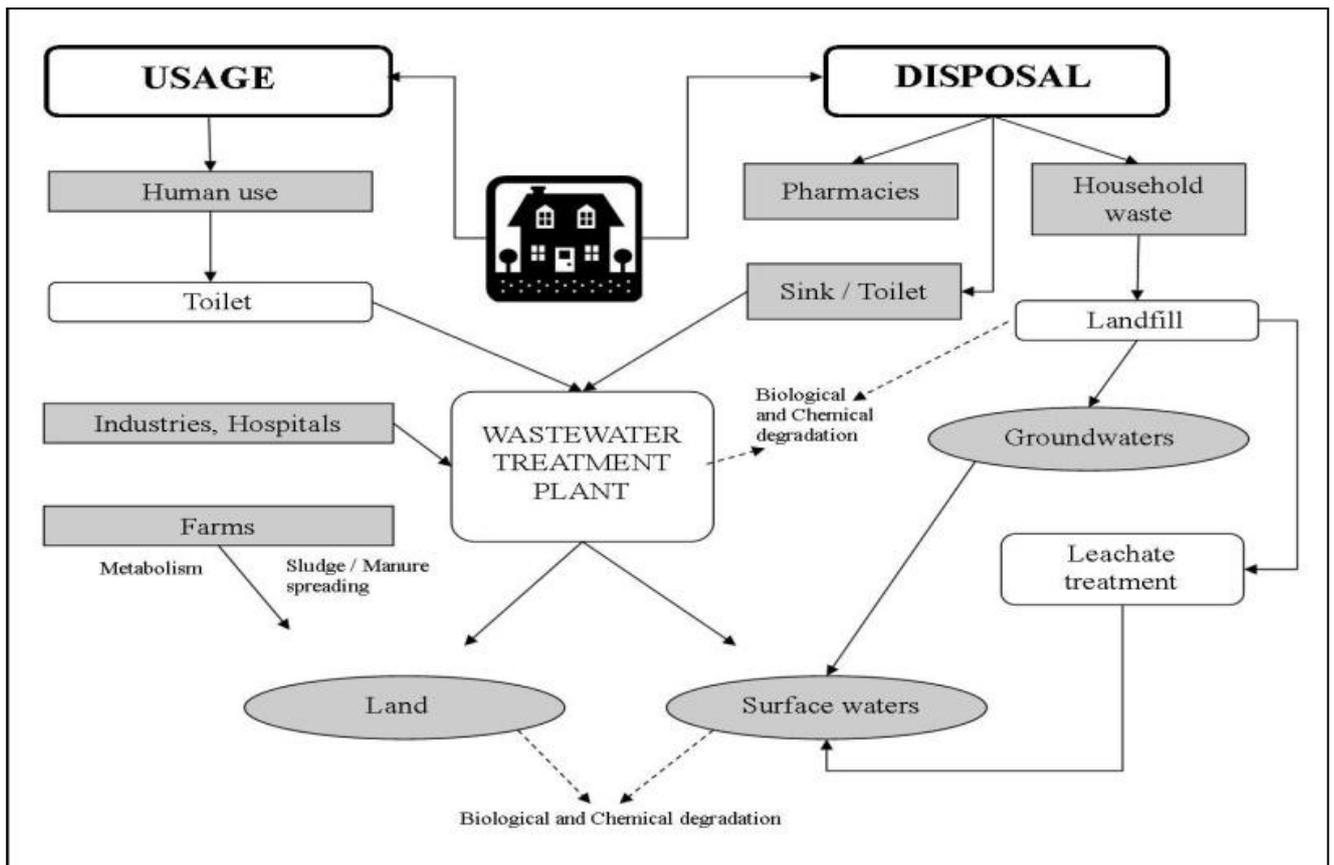


Fig. 2.1 La diversa provenienza dei farmaci (Fonte: Nikolaou et al, 2007)

2.4 IL DESTINO DEI FARMACI NELL'AMBIENTE

Il comportamento e il destino dei farmaci e dei loro metaboliti nell'ambiente acquatico non sono ben conosciuti. La bassa volatilità dei prodotti farmaceutici è indicata dalla loro presenza nell'ambiente che avviene principalmente attraverso il trasporto acquatico, ma anche tramite la dispersione della catena alimentare. Nel trattamento delle acque reflue, due processi di eliminazione sono generalmente importanti: assorbimento del particolato solido (fanghi digeriti) e la biodegradazione. L'assorbimento dipende sia dalle interazioni idrofobiche ed elettrostatiche dei farmaci con il particolato ma anche dai microrganismi e aumenta con l'abbassarsi del pH. Il processo più importante nell'eliminazione delle acque reflue è sicuramente la biodegradazione che è sensibile alla luce solare quindi dalla latitudine e stagione (Fent et al., 2006).

2.5 LE CONCENTRAZIONI AMBIENTALI

La presenza di farmaci nelle acque reflue trattate, fu riportata per la prima volta in U.S.A nel 1976 da Garrison et al., dove l'acido clofibrico era presente in un range di 0,8-2 µg/L. Successivamente i farmaci furono rilevati in Gran Bretagna nei fiumi fino a una concentrazione di 1 µg/L (*Richardson e Bowron*, 1985), e nel 1986 in Canada furono trovate nelle acque di scarico ibuprofene e naproxene (*Rogers et al.*, 1986). Negli ultimi anni aumentarono le conoscenze sulle concentrazioni ambientali di farmaci grazie allo sviluppo di tecniche analitiche che permettevano di individuare i composti polari presenti in quantità minime.

Recenti studi svolti in diverse città riportano concentrazioni di circa 80-100 farmaci e dei loro metabolismi trovati nelle acque reflue trattate, nei fiumi, nelle insenature, in liquami, in acque sotterranee (*Fent et al.*, 2006).

2.6 GLI EFFETTI ECOTOSSICOLOGICI

I farmaci sono disegnati per specifici bersagli metabolici e molecolari presenti nell'uomo e negli animali, ma essi sono anche in grado di provocare effetti collaterali rilevanti: quando queste sostanze vengono introdotte nell'ambiente infatti possono avere effetti sugli animali che hanno identici o simili organi bersaglio, tessuti, cellule o biomolecole. Alcuni recettori presenti negli animali inferiori assomigliano a quelli nell'uomo, altri invece sono differenti o mancanti, questo significa che i meccanismi d'azione possono essere molteplici. A questo proposito è importante riconoscere che per molti farmaci, gli specifici meccanismi d'azione non sono ancora del tutto conosciuti e spesso ve ne sono più di uno, questo rende l'analisi della specifica tossicità negli animali inferiori difficile da eseguire. Nonostante questo, gli esperimenti sulla tossicità del farmaco dovrebbero essere mirati e disegnati per specifici bersagli anche nei vertebrati non mammiferi e negli invertebrati, basati sull'ipotesi delle somiglianze dei meccanismi d'azione. Purtroppo attualmente le prove di tossicità non sono progettate in questo modo, ma sono piuttosto generiche; vengono utilizzati test tradizionali su organismi standard (*Fent et al.*, 2006). Gli organismi utilizzati in laboratorio appartengono a diversi livelli trofici, come le alghe, lo zooplancton, altri invertebrati e pesci (*Christen et al.*, 2010). I test di tossicità provvedono a indicare gli effetti acuti negli organismi sottoposti a un'esposizione di farmaci a breve termine, e solo raramente dopo un'esposizione a lungo termine valutando gli effetti cronici di questi. Questi dati sono utilizzati per l'analisi generica di rischio ambientale, ma non sono sufficienti per valutare il profilo tossicologico del componente (*Fent et al.*, 2006).

Le linee guida emanate nel 2006 dall’Agenzia di Medicina Europea hanno lo scopo di limitare i potenziali rischi ambientali provocati dai farmaci ad uso umano e veterinario. Per quanto riguarda i farmaci ad uso umano, se la concentrazione ambientale prevista (PEC) è superiore a 10 ng/L, il farmaco non viene sottoposto ad alcuna ulteriore indagine, a meno che non vi siano evidenze della sua tossicità a concentrazioni inferiori. Ma i laboratori scientifici mostrano che vari composti, come l’estradiolo di cui sopra, mostrano effetti anche a concentrazione inferiore a 10 ng/L e quindi alcune domande sorgono spontanee, per esempio se esistono altri composti farmaceutici molto attivi e come questi possono essere identificati.

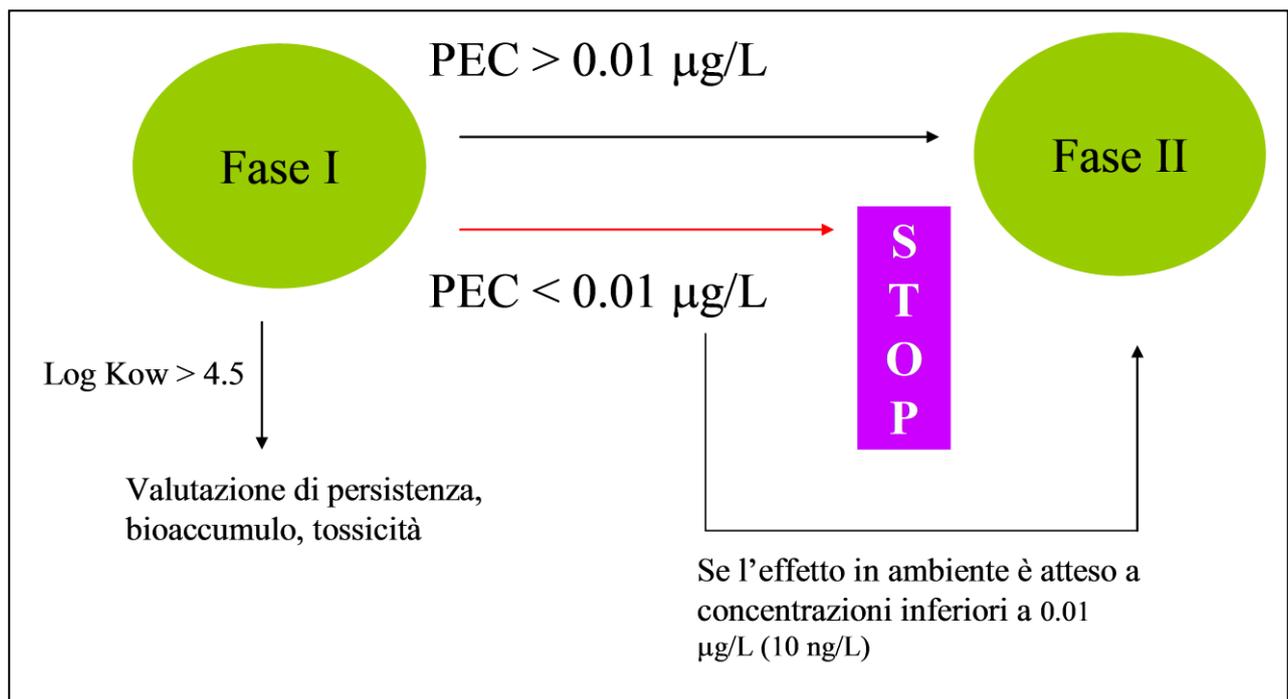


Fig. 2.2 Linee guida EMEA, 2006 per i farmaci ad uso umano

L’EMEA stessa ha quindi riconosciuto che queste linee guida non sono definitive, ma che sono necessari ulteriori approfondimenti. Un aspetto importante è quello di riconoscere se un certo farmaco presente in ambiente è altamente attivo; in questo senso una recente raccomandazione (*Christen et al.*, 2010) è quella di condurre un approccio graduale basato su tre principali livelli, che sono:

1. Identificazione del meccanismo d’azione del farmaco: se è specifico vi sono interazioni specifiche con bersagli umani (recettori o enzimi) e quindi il composto potrebbe essere altamente attivo anche su altri organismi; se è aspecifico il rischio che il composto sia altamente attivo è minore.

2. Valutazione del grado d'omologia fra i recettori ed enzimi presenti nell'uomo e delle specie animali. Se l'omologia è bassa il rischio che il composto sia altamente attivo è minimo. Se invece l'omologia è alta, cioè supera il 50%, il rischio è elevato.
3. Classificazione delle vie enzimatiche e recettoriali influenzate dal farmaco. Se il farmaco influenza un'importante via biologica può essere considerato altamente attivo. Se invece influenza solo il metabolismo non è considerato altamente attivo.

Lo schema sottostante illustra i tre livelli graduali per definire se un farmaco ambientale sia altamente attivo (*Christen et al., 2010*).

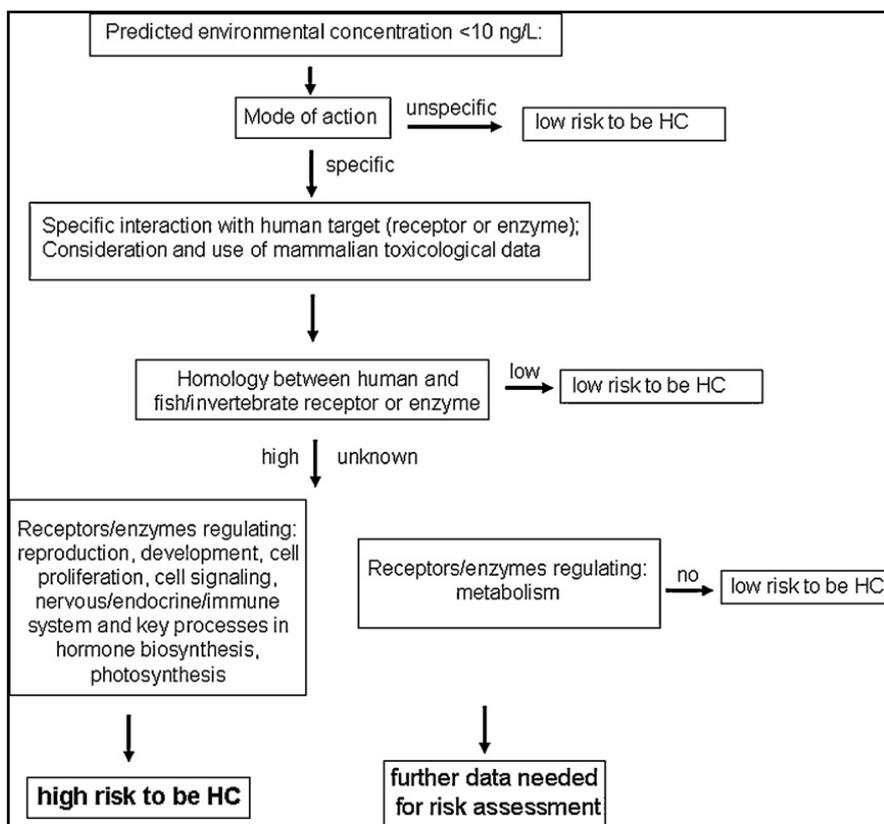


Fig. 2.3 Schema e criteri per l'identificazione di HC tra i farmaci umani (Fonte: *Christen et al., 2010*)

Se ne deduce che le ricerche condotte nei laboratori scientifici sono essenziali per fornire alle agenzie di protezione ambientale e/o ai legislatori delle informazioni circa quali farmaci siano da tenere in maggiore considerazione (perché altamente attivi) per introdurre limiti alla loro concentrazione ambientale e per promuovere la sintesi di farmaci sostitutivi più ecocompatibili. In considerazione del fatto che i farmaci non sono mai presenti in ambiente da soli, ma in miscele con altri farmaci oltre che con inquinanti generici, il problema è ancora di più difficile soluzione. Infatti

due o più farmaci possono interferire l'uno con l'altro, e produrre effetti additivi o sinergici. Dopo precedenti risultati ottenuti nel laboratorio di Fisiologia e Biochimica ambientale sull'effetto del propranololo (*Franzellitti et al.*, 2011) o della fluoxetina su parametri fisiologici del mitilo *Mytilus galloprovincialis*, in questa tesi viene preso in considerazione l'effetto che hanno due farmaci, da soli e in combinazione, sulla trasduzione del segnale chimico.

2.6.1 CONCENTRAZIONI AMBIENTALI DI FLUOXETINA

Kolpin et al. (2002) hanno identificato la presenza diffusa di molti prodotti farmaceutici nelle acque superficiali degli Stati Uniti. Tra questi contaminanti era presente la fluoxetina (FX), un inibitore selettivo del reuptake della serotonina (SSRI). L'11% della FX assunta viene rilasciata nell'ambiente (*Van Harten*, 1993), dove è resistente all'idrolisi e fotolisi (*Kwon e Armbrust*, 2006). Nell'organismo, la FX è metabolizzata dal citocromo P-450 a norfluoxetina (NFX), metabolita attivo (*Heimke e Hartter*, 2000), ed il 7% di questo composto viene escreto invariato attraverso le urine (*Van Harten*, 1993).

La fluoxetina è comunemente rilevata nei sistemi acquatici in concentrazioni che variano tra i 12 e i 540 ng/L (*Kolpin et al.*, 2002; *Brooks et al.*, 2003; *Metcalf e al.*, 2010) e questa sostanza si può accumulare nel cervello, fegato e tessuto muscolare dei pesci (*Mennigen et al.*, 2010). Diversi studiosi hanno dimostrato che la bioconcentrazione di fluoxetina nei tessuti di pesce, sia in quelli di laboratorio (*Paterson e Metcalfe*, 2008) che in quelli selvatici catturati (*Brooks et al.*, 2005) varia tra 74 e 80 per la FX e 117 per la NFX (*Paterson e Metcalfe*, 2008). Le più alte concentrazioni di FX e di NFX sono state ritrovate nel cervello, con valori medi pari a 1,6 ng/g di FX e di 8,9 ng/g di NFX (*Brooks et al.*, 2005). Numerosi dati dimostrano l'impatto dannoso che ha la FX sulla nutrizione (*Mennigen et al.*, 2009), sul comportamento (*Semsar et al.*, 2004) e sulla riproduzione (*Mennigen et al.*, 2008; *Lister et al.*, 2009) nei pesci.

2.6.2 CONCENTRAZIONI AMBIENTALI DI PROPRANOLOLO

Il perfezionamento delle tecniche analitiche ha dimostrato che ci sono in realtà molti prodotti farmaceutici nei nostri fiumi e nelle acque superficiali, tra cui beta-bloccanti usati per il trattamento di patologie cardiovascolari (*Fent et al.*, 2006; *Ternes et al.*, 2001). Il propranololo (PROP) raggiunge l'ambiente acquatico attraverso una varietà di percorsi, dopo una rimozione incompleta negli opportuni impianti di trattamento delle acque reflue. In alcuni impianti di depurazione in Germania si è riscontrato che il 96% del propranololo viene rimosso dai depuratori; tuttavia questa sostanza è stata trovata ubiquitariamente nei fiumi e torrenti in America e in Europa a concentrazioni dell'ordine dei ng/L, con le concentrazioni massime e medie che raggiungendo 590 e

12 ng/L, rispettivamente (*Ashton et al*, 2004.; *Huggett et al*, 2003b.; *Ternes*, 1998), negli estuari quella massima è di 56 ng/L (*Thomas e Hilton*, 2004) e 1900 ng/L negli affluenti delle acque di scarico (*Santos et al.*, 2010).

2.7 MECCANISMI D'AZIONE ED EFFETTI DI PROPRANOLOLO E FLUOXETINA

2.7.1 PROPRANOLOLO

Il PROP è il farmaco più rappresentativo della famiglia degli antagonisti dei recettori beta adrenergici, ovvero i beta-bloccanti. Questi agiscono come inibitori competitivi e sono usati nei trattamenti della ipertensione, e per prevenzione nei pazienti dopo aver subito attacchi di cuore. Il sistema adrenergico è coinvolto in molte funzioni fisiologiche così come la regolazione dell'apporto di ossigeno al cuore, della frequenza cardiaca, dei meccanismi di vasodilatazione dei vasi sanguigni e della broncodilatazione. Il sistema adrenergico è inoltre coinvolto inoltre nel metabolismo dei carboidrati e dei lipidi (*Jacob et al.*, 1998).

I recettori β -adrenergici sono proteine recettoriali transmembrana accoppiate con proteine G, che aumentano la sintesi del secondo messaggero AMPc coinvolto nel "signaling" intracellulare. Alcuni β -bloccanti possono selettivamente inibire uno o più tipi di β -recettori, per esempio i bloccanti β_2 sono usati nel trattamento dell'ipertensione evitando gli effetti cardiaci, poiché questo sottotipo di recettore non è stato trovato nel cuore. La selettività è basata su differenze di gruppi chimici aggiunti a componenti che sono capaci di aumentare l'interazione con aminoacidi dei domini transmembrana. Il propranololo è un antagonista generico dei recettori adrenergici β , agendo sia sui β_1 che sui β_2 e sui β_3 . Rispetto agli altri β -bloccanti, il PROP è il più lipofilo dato che in acqua di mare la sua K_{ow} è 3.5 (*Fent et al.*, 2006). Questa caratteristica lo rende più affine alle membrane biologiche, e quindi gli conferisce maggiore tendenza al bioaccumulo nei tessuti. Recenti studi hanno dimostrato che il PROP si accumula nei tessuti dei teleostei, e raggiunge concentrazioni ematiche pari a mg/L, superiori a quelle alle quali si ottiene l'effetto terapeutico nell'uomo (*Giltrow et al.*, 2009). Inoltre, il PROP è in grado di raggiungere concentrazioni di 360 $\mu\text{g/g}$ di tessuto (peso fresco) nei mitili (*Ericson et al.*, 2010).

2.7.2 FLUOXETINA

La fluoxetina è il farmaco più rappresentativo della famiglia degli inibitori del reuptake della serotonina (SSRI). L'effetto degli inibitori del reuptake della serotonina è quello di far permanere

più a lungo il neurotrasmettitore serotonina nelle fessure sinaptiche, quindi di aumentarne l'effetto. Questo neurotrasmettitore è coinvolto in molti meccanismi, sia ormonali che neuronali, ed è implicato in molteplici funzioni come ad esempio l'assunzione di cibo ed il comportamento sessuale, oltre che nel tono dell'umore. Gli SSRI sono principalmente indicati per la depressione, ma vengono anche prescritti per i trattamenti compulsivi del comportamento e per i disordini alimentari e di personalità (*Brooks et al.*, 2003). La fluoxetina è un farmaco messo in commercio quasi 20 anni fa, ed è il principio attivo del Prozac (*Van Harten*, 1993).

Una serie di studi recenti hanno documentato una vasta gamma di effetti che la fluoxetina può provocare sul comportamento e sulla fisiologia di alcuni organismi acquatici. Nei crostacei, la fluoxetina aumenta la dimensione delle ovaie e degli ovociti nel gambero *Procambarus clarkii* (*Kulkarni et al.*, 1992); analogamente, nel granchio violinista, *Uca pugilator*, può stimolare sia lo sviluppo ovarico (*Kulkarni e Fingerman.*, 1992) e testicolare (*Sarajini et al.*, 1993), mentre nei gamberetti e nei granchi violinisti promuove la dispersione del pigmento rosso (*Hanumante e Fingerman.*, 1983). Nei bivalvi, gli SSRI inducono un certo numero di processi riproduttivi compresa la emissione dei gameti (*Fong.*,1998; *Fong et al.*, 1998; *Honkoop et al.*, 1999), promuovono il movimento rotazionale della ciglia negli embrioni di gasteropodi (*Uhler et al.*, 2000), e inducono la metamorfosi larvale nei gasteropodi (*Cooper e Leise.*, 1996).

2.8 IL RUOLO DEI RECETTORI ADRENERGICI E SEROTONINERGICI NELLA COMUNICAZIONE CELLULARE

I cambiamenti dell'ambiente sono una caratteristica permanente della vita, e le cellule viventi devono affrontare in continuazione variazioni dell'ambiente interno e dell'ambiente esterno; inoltre possono anche trovarsi esposte alla presenza di sostanze tossiche. La capacità di poter rispondere a un cambiamento, fenomeno chiamato adattamento, è un elemento critico per la sopravvivenza di tutti gli organismi viventi e a livello cellulare è anche indicato come risposta cellulare.

Tutte le cellule viventi sono capaci di comunicare attraverso un processo noto come comunicazione o segnalazione cellulare, un fenomeno che comprende sia segnali in entrata che in uscita che possono influenzare le proprietà di una cellula. Inoltre, la comunicazione cellulare consiste non solo nel ricevere e trasmettere segnali, ma anche nell'interpretazione degli stessi. Perché ciò possa verificarsi, un segnale deve agire sulla conformazione o forma di una proteina cellulare, detta recettore. Quando una molecola segnale e un recettore interagiscono tra di loro, si verifica un cambiamento di conformazione di quest'ultimo provocando un certo tipo di risposta cellulare (*Brooker R. J. Biologia generale*).

2.8.1 LE TRE TAPPE DELLA COMUNICAZIONE CHIMICA

Le molecole segnale possono influenzare il comportamento di cellule poste a breve o lunga distanza, generalmente mediante l'interazione con un recettore che innesci una risposta cellulare (*Brooker R. J. Biologia generale*). I recettori della membrana cellulare sono proteine in grado di legare ligandi specifici presenti nell'ambiente extracellulare, e attivare conseguentemente proteine intracellulari trasduttrici, responsabili dell'innescio della specifica risposta da parte della cellula. La proprietà fondamentale dei recettori consiste, quindi, nel conferire ad ogni singola cellula la capacità di rispondere specificamente ai "segnali" chimici dell'ambiente circostante (*Marazziti et al., 1997*).

I tre stadi della segnalazione cellulare sono:

Stadio 1 → *Attivazione del recettore*: nello stadio iniziale una molecola segnale si lega ad un recettore producendo un cambiamento conformazionale del recettore stesso, attivandone la funzione.

Stadio 2 → *Trasduzione del segnale*: il segnale iniziale è convertito oppure trasmesso a un segnale differente all'interno della cellula. Il processo è a carico di un gruppo di proteine che costituiscono la via di trasduzione del segnale. Queste proteine a loro volta subiscono una serie di cambiamenti che possono anche portare alla sintesi di un'altra molecola segnale.

Stadio 3 → *Risposta cellulare*: le cellule possono rispondere ai segnali in diversi modi, per esempio alterando l'attività di uno o più enzimi, oppure modificando le funzioni delle proteine strutturali o infine cambiando l'espressione genica agendo su una proteina regolatrice di un determinato gene (*Brooker R. J. Biologia generale*).

2.8.2 RECETTORI ACCOPPIATI A PROTEINE G

I recettori accoppiati a proteine G sono dei recettori di membrana che mediano i loro effetti attraverso l'attivazione di una proteina affine ai nucleotidi guaninici GTP e GDP (da cui la G), quindi tramite una cascata di eventi biochimici che portano alla formazione dei secondi messaggeri all'interno della cellula.

L'analisi delle sequenze aminoacidiche, dedotte mediante sequenziamento dei geni codificanti i diversi recettori accoppiati a proteine G, ha evidenziato la presenza di caratteristiche strutturali comuni. Tutti questi recettori infatti sono proteine di membrana costituite da 450-600 aminoacidi contenenti sette regioni idrofobiche di lunghezza 20-25 aminoacidi, che attraversano la membrana

plasmatica. A queste sette α -eliche si aggiungono sei anse idrofiliche (tre extracellulari e tre citoplasmatiche) di collegamento fra le α -eliche. L'estremità amino-terminale è extracellulare, quella carbossi-terminale è intracellulare (Fig. 2.4).

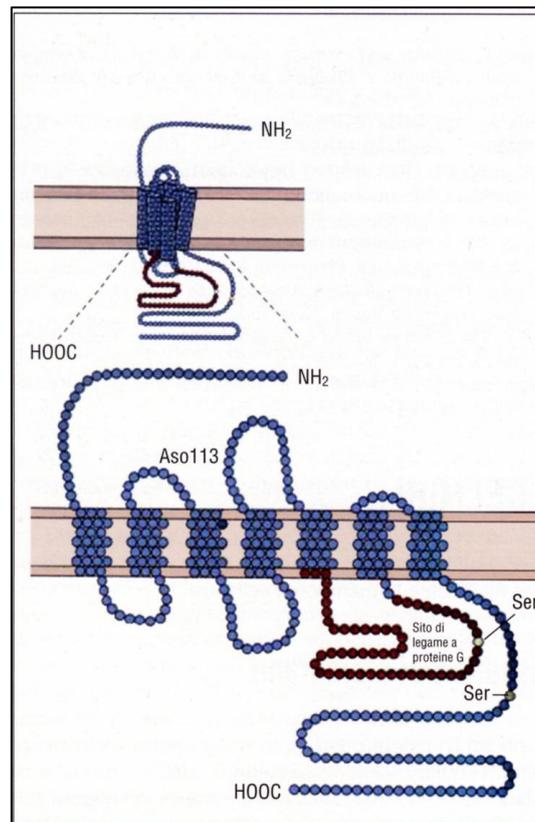


Fig. 2.4 Rappresentazione grafica del recettore a 7 domini transmembrana accoppiato a proteina G

I siti di riconoscimento per i ligandi (neurotrasmettitori, ormoni e farmaci, agonisti ed antagonisti) si trovano sulla porzione N-terminale o in tasche formate dall'insieme di segmenti transmembrana.

Appartengono a questa classe numerosi recettori tra cui i recettori adrenergici, i recettori per la serotonina, la dopamina e l'istamina, e altri ancora. I recettori accoppiati a proteina G sono coinvolti nell'insorgenza e/o nel controllo di tutti i principali processi metabolici cellulari e la loro alterazione funzionale è responsabile di numerose patologie, in particolare nell'ambito del sistema nervoso (Marazziti et al., 1997).

2.8.3 RECETTORI ADRENERGICI

I recettori adrenergici (ARs) appartengono alla superfamiglia di recettori accoppiati alla proteina G (G Protein Couplet Receptors, GPCR) (Millar *et al.*, 2010) e si suddividono in due tipi principali, gli α ARs e i β ARs. Per ciascuno di questi sono stati identificati nei mammiferi diversi sottotipi: α_{1a} , α_{1b} , α_{1d} , α_{2a} , α_{2b} , α_{2c} e β_1 , β_2 , β_3 (Civantos-Caldaza *et al.*, 2001, Strosberg., 1995). E' ben noto che nei vertebrati i recettori α_1 , α_2 , e β sono accoppiati a sistemi di trasduzione del segnale differenti, che comportano la modificazione della concentrazione intracellulare di II messaggeri diversi. Infatti, il legame di agonisti ai recettori α_1 induce un aumento della concentrazione intracellulare di IP3 e calcio; quella ai recettori α_2 induce la diminuzione della concentrazione intracellulare di AMPc previa inibizione dell'enzima adenilil ciclasi, mentre il legame di un agonista ai recettori β di qualsiasi sottotipo determina l'aumento della concentrazione intracellulare di AMPc, previa attivazione dell'enzima adenilil ciclasi (Fabbri e Moon, 1994).

Nei bivalvi sono stati identificati recettori adrenergici di tipo α e β che mostrano proprietà farmacologiche molto simili agli adrenocettori presenti nei mammiferi, anche se non sono stati svolti studi specifici sulla classificazione dei sottotipi recettoriali (Fabbri e Capuzzo, 2010). In seguito ricerche condotte su differenti specie risulta che gli α recettori sono accoppiati all'aumento intracellulare del livello di Ca^{2+} e quelli β sono responsabili dell'aumento della concentrazione di AMPc (Lacoste *et al.*, 2001c; Dailianis *et al.*, 2005; Shpakov *et al.*, 2005; Koutsogiannaki *et al.*, 2006).

2.8.4. RECETTORI SEROTONINERGICI

Dal punto di vista evolutivo, la serotonina (5-idrossitriptamina, 5-HT) è uno dei più vecchi neurotrasmettitori/ormoni, e si pensa che i suoi recettori siano apparsi 700-800 milioni di anni fa nelle cellule eucariotiche; sono stati poi trovati in numerose specie, dagli invertebrati all'uomo, e risultano piuttosto conservati (Hannon e Hoyer, 2008).

La serotonina produce i suoi effetti attraverso una varietà di recettori di membrana, i quali sono presenti sia nel sistema nervoso centrale che in quello periferico, oltre che in tessuti non neuronali come per esempio il sistema sanguigno, gastro-intestinale, endocrino, sensoriale, cardiovascolare e altri (Hoyer *et al.*, 2002). La classificazione attuale descrive sette famiglie di recettori: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇. Sottotipi recettoriali diversi presentano differenze significative in termini di localizzazione e sequenze aminoacidiche, struttura proteica, sistemi di trasduzione e funzioni fisiologiche (Hannon e Hoyer., 2008).

Le famiglie recettoriali 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₄₋₇ sono costituite da proteine di membrana monomeriche a sette domini transmembrana accoppiate alla proteina G (*Hannon e Hoyer, 2008*), mentre il recettore 5-HT₃ è un canale ionico controllato da ligando (la serotonina, appunto) che permette il flusso di Na⁺ e K⁺ (*Hoyer et al., 2002*). Inoltre è nota l'esistenza del recettore 5-HT_{1P} che ad oggi non è incluso nella nomenclatura IUPHAR dei recettori serotoninergici e quindi è considerato come un recettore “orfano” (*Hannon e Hoyer, 2008*).

In particolare, nei mammiferi i recettori 5-HT₁ e 5-HT₇ sono accoppiati all'inibizione e all'attivazione dell'adenilil ciclasti, rispettivamente (*Fabbri e Capuzzo., 2010*).

Subtype	5-HT _{1A}	5-HT _{1B}	5-HT _{1D}	5-ht _{1E}	5-ht _{1F}	5-HT _{2A}	5-HT _{2B}	5-HT _{2C}	*5-HT ₃	5-HT ₄	5-ht _{5A}	r5-ht _{5B}	5-ht ₆	5-HT ₇
5-HT _{1A}	100	53	52	49	53	42	42	45	14	36	48	49	43	49
5-HT _{1B}	43	100	71	56	60	43	39	38	27	39	43	42	39	46
5-HT _{1D}	43	63	100	58	57	41	40	42	44	40	45	43	41	46
5-ht _{1E}	40	48	48	100	66	45	40	43	30	41	46	47	40	48
5-ht _{1F}	42	49	48	57	100	46	42	44	29	44	48	46	42	48
5-HT _{2A}	30	30	29	34	32	100	52	57	0	36	36	35	36	38
5-HT _{2B}	34	27	27	30	29	45	100	53	29	37	37	37	36	37
5-HT _{2C}	32	28	30	32	32	51	42	100	18	39	40	36	37	37
*5-HT ₃	14	22	22	10	14	0	18	16	100	21	32	22	29	0
5-HT ₄	29	32	31	32	34	28	29	28	21	100	42	38	35	42
5-ht _{5A}	36	35	34	35	37	27	26	31	22	32	100	75	38	42
r5-ht _{5B}	39	34	33	35	36	27	29	29	22	30	70	100	38	44
5-ht ₆	34	31	32	32	32	27	27	27	24	27	30	31	100	40
5-HT ₇	38	37	38	39	38	28	28	28	0	32	33	34	33	100

Fig. 2.5 Omologia a livello aminoacidico dei recettori serotoninergici nei mammiferi (Fonte: *Hoyer et al., 2002*)

Il recettore 5-HT₁ presenta 5 sottotipi (A, B, D, E, F) tutti accoppiati a proteine G_i e proteine G_o, quindi mediano la riduzione della concentrazione di AMP-ciclico (AMPC). Inoltre, almeno uno dei sottotipi 5-HT₁, il recettore 5-HT_{1A}, attiva anche un canale al K⁺ ligando-dipendente e inibisce un canale per il Ca²⁺ voltaggio-dipendente (*Hannon e Hoyer., 2008*). I recettori 5-HT₂ sono invece coinvolti nella stimolazione della fosfolipasi C (PLC), portando all'aumento di Ca²⁺ e all'attivazione di PKC (*Fabbri e Capuzzo., 2010*).

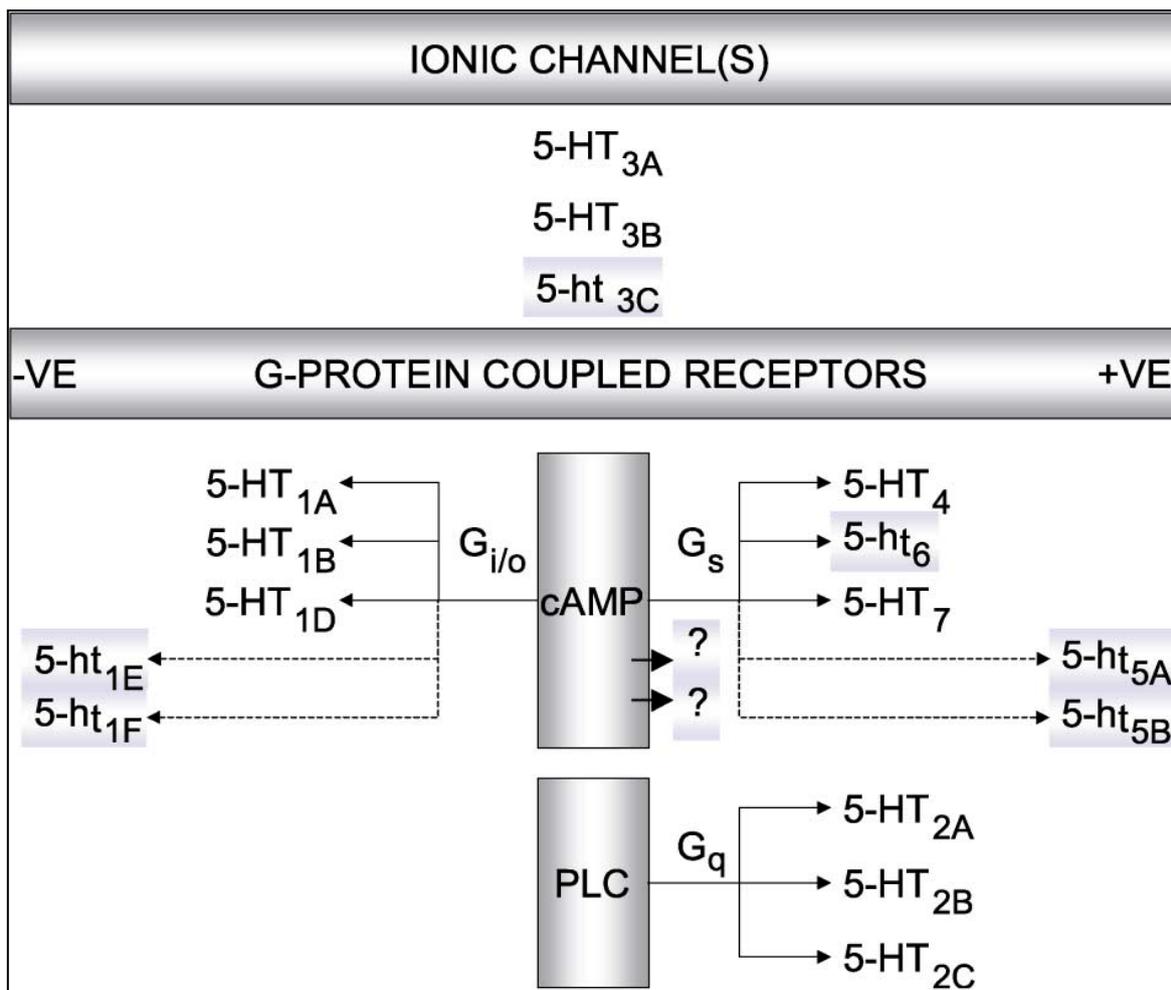


Fig. 2.6 Rappresentazione grafica dell'attuale classificazione dei recettori 5-HT e dei rispettivi sottotipi recettoriali. Abbreviazioni: 3'-5' adenosina monofosfato ciclico (AMPC); fosfolipasi C (PLC), negativo (-ve), positivo (+ ve). (Fonte: *Hoyer et al., 2002*)

Nei molluschi, la classificazione farmacologica e molecolare dei recettori 5-HT e la loro correlazione con le specifiche funzioni fisiologiche sono poco conosciute, lo studio più ampio in proposito indica la presente essenzialmente soltanto del recettore 5-HT₁ (*Tierney, 2001*). In seguito agli studi approfonditi sui molluschi bivalvi, si pensa che il recettore 5-HT dei molluschi sia strutturalmente omologo al recettore 5-HT₁ presente nei mammiferi, anche se a livello farmacologico mostra caratteristiche miste tra il recettore 5-HT₁ e quello 5-HT₂ (*Tierney, 2001*).

Molto recentemente, è stato isolato e caratterizzato il gene codificante per il recettore 5-HT del *M. edulis* che risulta omologo al recettore 5-HT₁ dei mammiferi (*Cubero-Leon et al., 2010*). Su queste basi, l'interazione con la 5-HT dovrebbe portare alla riduzione dei livelli di AMPC anche se questi approfondimenti non sono ancora stati svolti.

Cubero-Leon *et al.*, (2010) ha dimostrato che la variazione naturale dell'espressione genica del recettore per la 5-HT nei campioni di controllo del *M. edulis* non è statisticamente significativa tra i sessi o tra le varie fasi di sviluppo, mentre viene modificata in seguito all'esposizione ad estrogeni. Questi impatti sono però specifici per le diverse fasi del ciclo riproduttivo dei mitili, e quindi per valutare gli effetti degli xenobiotici in questi organismi acquatici è importante tener conto del diverso assetto fisiologico (ad esempio maggiore o minore espressione dei recettori, maggiore o minore affinità per agonisti, etc.) nelle diverse fasi riproduttive (Cubero-Leon *et al.*, 2010).

2.9 LA VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE AMPc-DIPENDENTE

Il segnale viene trasmesso all'interno della cellula grazie all'interazione di tre complessi proteici: l'adenilil ciclasi, le proteine G e la proteina chinasi A.

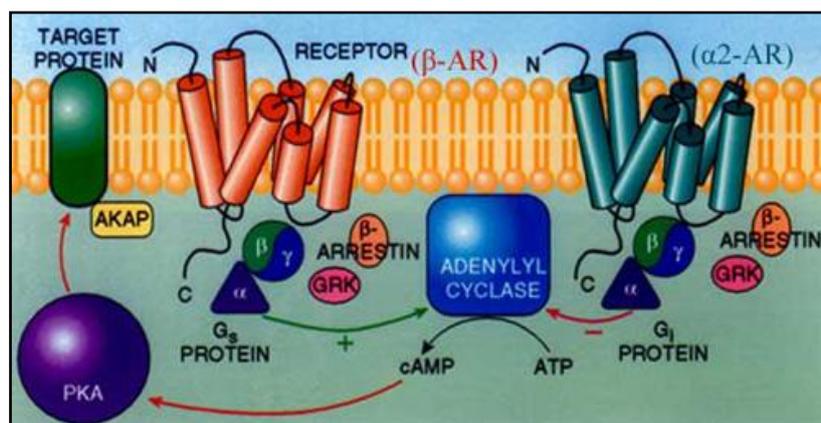


Fig. 2.7 Raffigurazione dei 3 complessi proteici: adenilil ciclasi, proteina G e PKA

La trasduzione del segnale AMPc-dipendente è responsabile del controllo di molte funzioni fisiologiche sia nelle cellule di mammifero ma anche in quelle di vertebrati non mammiferi e invertebrati. In seguito a prove di profilo biologico e genetico è stato rilevato che il AMPc è implicato in una vasta gamma di processi biologici, includendo oogenesi ed embriogenesi, sviluppo, secrezione ormonale, olfatto, contrazioni cardiache, rilassamento del muscolo liscio, metabolismo e altri meccanismi. Nei mammiferi la conoscenza dell'implicazione del AMPc in numerosi processi biologici, viene anche sfruttata per applicazioni terapeutiche, mentre sono scarse le conoscenze riguardo i vertebrati non mammiferi e gli invertebrati. Vari laboratori si sono occupati recentemente della trasduzione del segnale AMPc-dipendente nei molluschi bivalvi, sia perché sono ampiamente coltivati in acquacoltura ed il AMPc ha importanti effetti correlati alla riproduzione, sia perché

sono organismi sentinella utilizzati per valutare la qualità ambientale e i livelli di AMPc sono soggetti ad alterazione per esempio da metalli pesanti (*Fabbri e Capuzzo, 2010*).

2.10 IL COMPLESSO DELL' ADENILIL CICLASI NEI MAMMIFERI

Il principale controllo della concentrazione intracellulare di AMPc è influenzato dall'enzima che ne catalizza la formazione, l'adenilil ciclasi (AC). Questo rappresenta la porzione catalitica di un complesso formato nel suo insieme da: un recettore di membrana composto da sette α eliche che attraversano sette volte la membrana plasmatica, dalla proteina G eterotrimerica ($\alpha\beta\gamma$) e dalla stessa porzione catalitica. L'occupazione del recettore da parte di un agonista porta all'attivazione di diverse proteine G regolatrici, che possono stimolare o inibire l'AC, così che il livello citosolico del secondo messaggero AMPc può crescere o diminuire, rispettivamente (*Fabbri e Capuzzo, 2010*). Nei mammiferi sono presenti nove isoforme di AC raggruppate in varie sottoclassi secondo le molecole da cui sono regolate (*Sunahara e Taussig, 2002*).

Tutte le isoforme dell'adenilil ciclasi condividono una struttura primaria costituita da una regione N-terminale variabile e due regioni transmembrana, ciascuna formata da sei eliche che attraversano la membrana e due regioni citosoliche C₁ e C₂. Ciascun dominio citosolico comprende subdomini Ca e Cb che eterodimerizzano a formare il nucleo catalitico pseudosimmetrico. Quest'ultimo crea due siti lungo l'interfaccia del dominio, un sito per il legame del substrato, l'ATP, e l'altro per l'attivatore, il magnesio (*Fabbri e Capuzzo, 2010*).

2.10.1 LA PROTEINA G

Ormoni e neurotrasmettitori, così come altri stimolanti chimici, portano i recettori a un cambiamento conformazionale che propaga l'attivazione di una proteina G_s (s da stimolatrice) tramite interazioni proteina-proteina. Il cambiamento conformazionale del recettore fa in modo che quest'ultimo possa interagire con la proteina G inattiva sul lato interno della membrana. Questo induce la proteina G ad espellere un nucleotide guanidinico, il GDP, sostituendolo con GTP. Tale cambiamento causa la separazione delle diverse subunità di cui è formata la proteina G, una subunità α s legata al GTP e un complesso $\beta\gamma$ libero. La subunità α spostandosi lungo la membrana attiva l'AC, mentre il complesso $\beta\gamma$ può influenzare positivamente o negativamente l'enzima, a seconda dell'isoforma. La terminazione del segnale avviene grazie all'attività intrinseca GTPasica della subunità α , che tramite l'idrolisi di GTP a GDP permetta la riassociazione con il dimero $\beta\gamma$. Le diverse sequenze aminoacidiche della subunità α permettono di catalogare le proteine G in quattro

classi: G_s, G_i, G_q e G₁₂. G_s e G_i sono direttamente coinvolte nella traduzione del segnale AMPc-dipendente, in particolare come visto sopra G_s stimola l'AC, mentre G_i la inibisce. G_q attiva la PLC, mentre G₁₂ permette un aumento di GMPc.

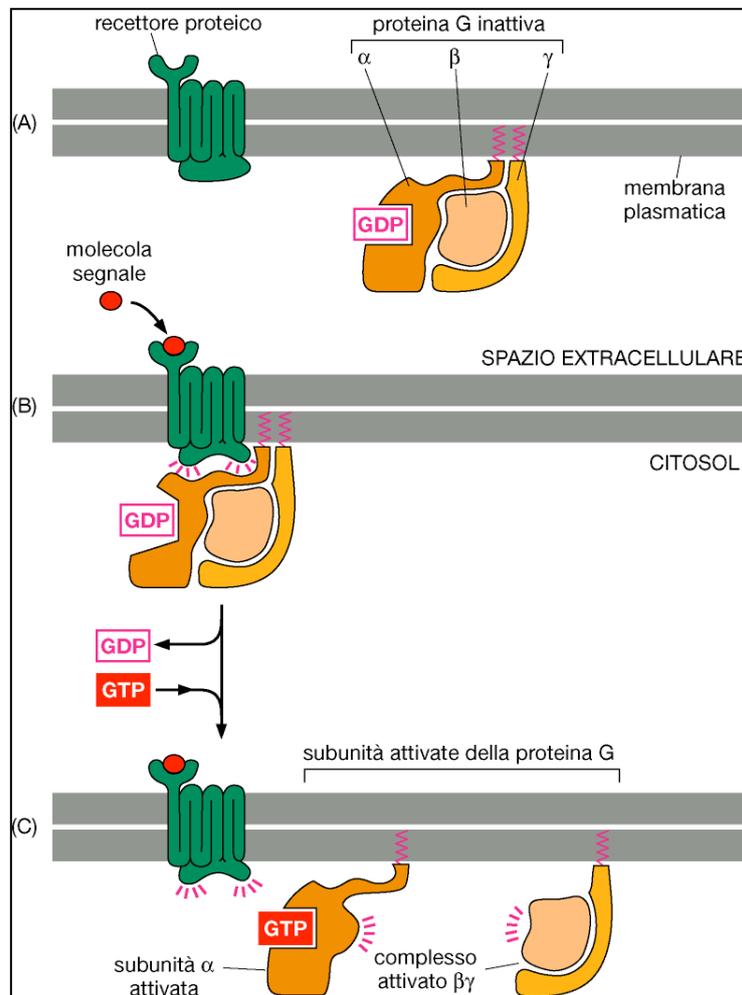


Fig. 2.8 Attivazione della proteina G trimerica (*Biologia molecolare della cellula*, 2008).

La chiave della regolazione della AC da parte della proteina G è l'interfaccia tra il dominio C₁ e C₂ che forma un sito di legame per l'ATP. Il ruolo dell'AC è catalizzare la formazione di AMPc partendo da ATP; a sua volta il nucleotide ciclico attiva il suo substrato fisiologico, l'enzima protein chinasi A (PKA) AMPc dipendente (*Fabbri e Capuzzo*, 2010).

2.10.2 LA PKA NEI MAMMIFERI

La PKA esiste in una forma tetramericata inattiva costituita da due subunità regolatrici (R) e due catalitiche (C). Il AMPc legandosi a ciascuna subunità regolatoria promuove la dissociazione dell'oloenzima in un dimero R-R e due subunità monometriche e catalitiche attive C-C.

Le chinasi sono enzimi che fosforilano substrati utilizzando un gruppo fosforico proveniente dall'ATP. Le subunità catalitiche della PKA fosforilano varie proteine cellulari che in questo modo vengono attivate (o disattivate) portando alla regolazione di molte funzioni fisiologiche. La PKA può entrare nel nucleo, ove modula l'espressione genica (Fabbri e Capuzzo, 2010).

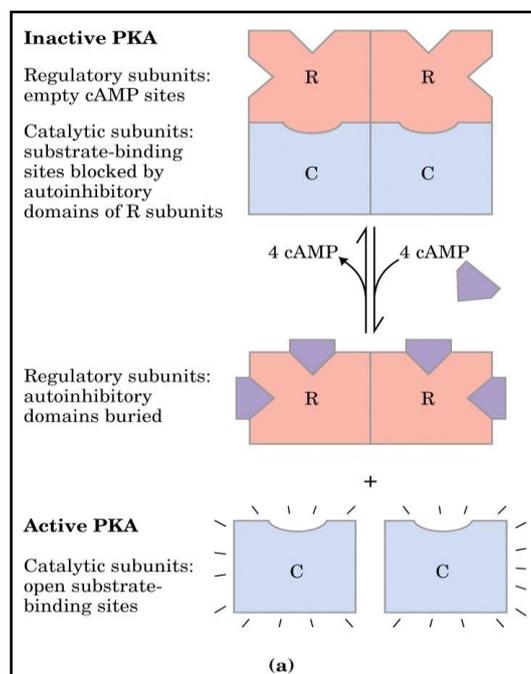


Fig. 2.9 Attivazione della PKA tramite AMPc (*Biologia molecolare della cellula, 2008*)

2.11 LA TRASDUZIONE AMPc-DIPENDENTE NEI BIVALVI

2.11.1 IL SISTEMA AC-AMPc

Nei mitili il AMPc ha effetti modulatori sul sistema cardiovascolare, regola il movimento del mantello e del sifone, induce il rilassamento del muscolo adduttore, attiva il movimento delle ciglia laterali e induce la riproduzione. Il sistema AC/AMPc è coinvolto anche nella maturazione delle gonadi tramite il suo importante effetto metabolico, quale l'induzione della glicogenolisi nel mantello, al fine di produrre glucosio utile per lo sviluppo delle gonadi (Fabbri e Capuzzo, 2010).

Le conoscenze sulle proteine G e le isoforme di AC nei bivalvi restano tuttavia molto limitate rispetto alle nozioni sui mammiferi (*Fabbri e Capuzzo, 2010*).

Nei diversi tessuti i livelli di AMPc possono cambiare a causa di modulatori endogeni ed esogeni (*Fabbri e Capuzzo, 2010*). Il sistema AC/AMPc partecipa inoltre al meccanismo di risposta alla presenza di inquinanti come il 17- β -estradiolo ed il cadmio (*Raftopoulou et al., 2006*). Altri studi mostrano che il livello di AMPc è maggiore nei tessuti di mitili prelevati da zone inquinate rispetto a siti non contaminati (*Dailianis et al., 2003*). Lo stesso si può affermare per la presenza di metalli pesanti, in aggiunta dei quali il livello di AMPc aumenta (*Fabbri e Capuzzo., 2006*). Altri lavori hanno mostrato che ci sono alcuni farmaci che modulano negativamente i livelli intracellulari di AMPc, come ad esempio la carbamazepina (*Martin-Diaz et al., 2009*) e il propranololo (*Franzellitti et al, 2011*).

2.11.2 LA PKA

La fosforilazione mediata dalla PKA è coinvolta nella regolazione di molti processi fisiologici specifici che si svolgono nei molluschi bivalvi, infatti svolge un ruolo cruciale nel rilassamento/contrazione del muscolo adduttore, nella mobilità degli spermatozoi e nella maturazione degli ovociti (*Bardales et al., 2009*). In questi animali sono presenti due isoforme della subunità regolatrice R, nominate R_{myt1} e R_{myt2} le cui sequenze parziali sono omologhe a quelle presenti nei mammiferi, rispettivamente nella subunità RI e RII (*Díaz-Enrich et al., 2003; Bardales et al., 2007*). Sia R_{myt1} che R_{myt2} mostrano uguale massa molecolare ma differiscono per le loro proprietà fisico-chimiche, immunogeniche e biochimiche (*Cao et al., 1995; Rodríguez et al., 1998; Bardales et al, 2007*). R_{myt1} e R_{myt2} coesistono in molti tipi cellulari ma con una differente localizzazione: in generale R_{myt1} è presente nel citoplasma di diverse tipologie di cellule, quelle epiteliali sia dei palpi labiali, dell'intestino, e dei condotti digerenti, nelle cellule dei tubuli digestivi, nelle cellule dei filamenti branchiali e nelle fibre dei muscoli della presa; mentre R_{myt2} si trova nelle cellule apicali, periferiche del mantello, nelle ciglia e nel flagello degli spermatozoi. R_{myt1} è un'isoforma solubile, mentre R_{myt2} sembra essere associata con la struttura cellulare e con gli organelli, attraverso l'interazione con le proteine di ancoraggio (*Bardales et al., 2010*). La distribuzione complementare delle due isoforme della PKA indica che sono coinvolte nella regolazione dei diversi processi cellulari secondo le loro particolari proprietà funzionali. La PKA_{myt1} è distribuita uniformemente all'interno delle fibre, mentre la PKA_{myt2} è stata riscontrata solo nelle cellule periferiche. Per questa ragione si pensa che PKA_{myt1} sia l'isoforma di PKA coinvolta direttamente nella regolazione dello stato del muscolo (*Bardales et al., 2010*). Queste due isoforme della PKA sono coinvolte nelle gametogenesi: l'attività della PKA_{myt2} mostra un'elevata

dipendenza con la temperatura, in particolare a temperatura superiori ai 15°C (*Bardales et al.*, 2004). Questo suggerisce che la temperatura dell'acqua marina potrebbe essere un importante fattore di regolazione della mobilità degli spermatozoi nei molluschi bivalvi. R_{myt1} e R_{myt2} sono assenti negli oociti all'interno dei follicoli, ma entrambe le isoforme sono altamente espresse negli oociti rilasciati dai follicoli e raccolti dopo la deposizione delle uova. Questo risultato suggerisce che i follicoli femminili contengono un fattore indefinito che impedisce l'espressione di PKA negli oociti immaturi (*Bardales et al.*, 2009).

2.12. LA P-GLICOPROTEINA E LA MULTI XENOBIOTIC RESISTANCE

Sulla base di conoscenze inerenti le cellule di mammifero, studi precedenti del nostro laboratorio (*Franzellitti e Fabbri*, 2006) hanno formulato l'ipotesi che anche negli invertebrati il pathway AMPc/PKA dipendente descritto in precedenza moduli l'attività della P-glicoproteina (Pgp) attraverso la regolazione del gene codificante. Gli organismi acquatici, ed in particolare quelli filtratori come i mitili, sono continuamente esposti ad una moltitudine di sostanze tossiche disciolte nell'acqua che possono essere sia di origine naturale che antropogenica. Per sopravvivere in questo ambiente, gli organismi acquatici, presentano un sistema di difesa che prende il nome di multi xenobiotic resistance (MXR; *Kurelac*, 1992) che è in grado di espellere all'esterno della cellula i numerosi xenobiotici endogeni ed esogeni, prevenendo l'accumulo intracellulare ed il potenziale effetto tossico. Le basi molecolari del MXR negli organismi acquatici sono simili a quel fenomeno ben conosciuto di multi drug resistance (MDR), implicato nella resistenza delle cellule tumorali alla chemioterapia. Entrambi i meccanismi di difesa infatti sfruttano una proteina transmembrana, Pgp, di struttura dimerica fosforilata e glicosidata, costituita da 1280 aminoacidi. Ogni sua subunità è costituita da sei regioni transmembrana, composta da un dominio citosolico e un sito di legame per l'ATP (*Chen et al.*, 1986).

La funzione primaria della Pgp è pompare fuori dalla cellula l'ampia varietà di sostanze xenobiotiche, includendo farmaci e tossine di origine naturale, con una modalità ATP-dipendente. L'esporto di xenobiotici da parte della Pgp e di altri trasportatori della classe ATP Binding Cassette (ABC) richiede l'idrolisi di 2-3 molecole di ATP per molecola di sostanza trasportata (*Ambudkar et al.*, 1999; *Hennessy e Spiers*, 2007).

Il meccanismo con cui la Pgp trasporta gli xenobiotici fuori dalla cellula non è del tutto chiaro, ma sono stati proposti tre modelli di trasporto. Nel primo, definito *hydrophobic vacuum cleaner*

(Higgins e Grottesman, 1992), attraverso un sistema di ricognizione a due livelli, le molecole bersaglio idrofobe sono espulse facilmente essendo permeabili alla membrana cellulare. Il secondo modello, detto *flippase* (Higgins e Grottesman, 1992), prevede che la Pgp, inserendosi all'interno della membrana cellulare, sposti le molecole bersaglio fuori dalla cellula contro gradiente di concentrazione. Il terzo modello di *estrazione dallo stato interno*, consiste in un'integrazione dei due modelli precedenti (Eytan e Kuchel, 1999). La Pgp presenta un'ampia varietà di substrati le cui caratteristiche più comuni sono una moderata solubilità nei lipidi, basso peso molecolare, planarità, molecole cationiche o neutre ma mai anioniche, tra le quali si possono ritrovare steroidi, antiipertensivi, antibiotici, antiparassitari (Bard, 2000).

La Pgp, così come gli altri trasportatori della stessa famiglia, sono la prima linea di difesa contro l'accumulo intracellulare di xenobiotici. Qualora esse dovessero essere sopraffatte da un'eccessiva dose di xenobiotici interverrebbero altri meccanismi di difesa, "in seconda linea", che prevedono l'impiego di enzimi di detossificazione (CYP 450) che metabolizzano gli xenobiotici a composti che possono essere più facilmente escreti all'esterno (Bard, 2000).

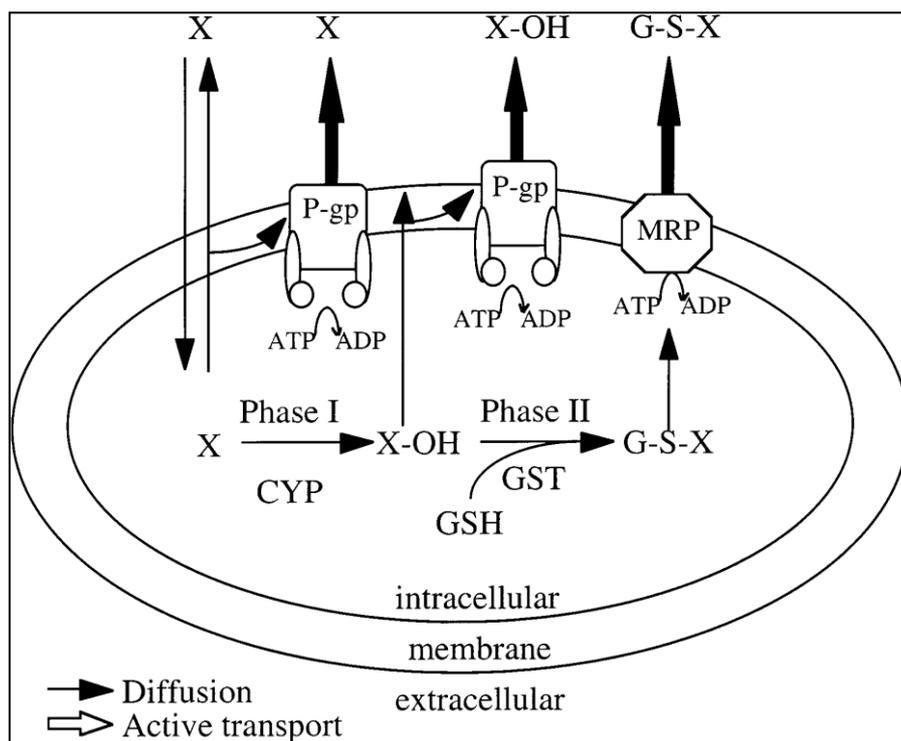


Fig. 2.10 Modello speculativo della resistenza agli xenobiotici fornita da trasportatori attivi transmembrana, Pgp e MRP e da enzimi di detossificazione della I e II fase, il citocromo P450 (CYP) e il glutazione S trasferasi (GST), rispettivamente (Fonte: Bard, 2000)

Nei mitili l'espressione dei geni associati a MXR, tra cui il gene ABCB1 che codifica per la Pgp (Franzellitti *et al.*, 2011), è influenzata dall'esposizione degli stessi a metalli e agli inquinanti organici (Franzellitti e Fabbri, 2006), o all'esposizione a farmaci (Martin-Diaz *et al.*, 2009).

Sembra che il fenotipo MXR non sia necessariamente legato all'inquinamento, ma possa anche essere responsabile delle risposte ai fattori naturali come per esempio: i cambiamenti di temperatura stagionali (Chin *et al.*, 1990; Minier *et al.*, 2000; Keppler e Ringwood, 2001), certi ormoni (Quian e Beck, 1990), o alcuni substrati endogeni e metabolici (Toomey *et al.*, 1996; Smital *et al.*, 1996).

L'espressione di Pgp è quindi considerata come un biomarker dello stress ambientale piuttosto biomarker di esposizione a contaminanti specifici (Ivanina e Sokolova., 2008).

3. MATERIALI E METODI

3.1 II MITILO MEDITERRANEO (*Mytilus galloprovincialis*)

L'organismo modello selezionato per questo lavoro è il mitilo Mediterraneo (*Mytilus galloprovincialis*) appartenente alla famiglia Mytilidae, ordine Mytiloida, classe Bivalvia, phylum Mollusca. Sono bivalvi sessili che vivono nella zona intertidale, ancorati a substrati rocciosi tramite il bisso, il quale è originato da una secrezione della ghiandola del bisso situata nel piede, e che indurendosi lega stabilmente l'animale al substrato quando viene retratto il piede. Il loro corpo è compresso lateralmente e racchiuso da una conchiglia, formata da due valve, tenute insieme dorsalmente da un legamento a cerniera che ne determina l'apertura. Questa particolare caratteristica permette all'animale di evitare l'essiccamento durante le fasi di bassa marea, chiudendo in maniera ermetica le valve e tenendovi all'interno un certo quantitativo d'acqua (Mitchell, Mutchmor e Dolphin, Zoologia). Internamente le valve sono ricoperte dal mantello, che è un tessuto essenziale per la sopravvivenza di questi organismi perché è responsabile dell'accumulo delle sostanze di riserva e dello sviluppo delle gonadi (Lubet, 1957), nel quale circolano anche i gas. Le branchie svolgono una duplice funzione perché oltre ad essere coinvolte negli scambi gassosi (coadiuvate dal mantello), fungono anche da filtro per l'acqua a scopo alimentare. Questi organismi si cibano trattenendo la materia organica dall'acqua che penetra attraverso un sifone inalante, passa per le branchie e viene in seguito espulsa attraverso un sifone esalante.

Questo bivalve è ampiamente utilizzato a livello internazionale nei programmi di biomonitoraggio di ambienti marini costieri e di transizione in quanto sono elevate le conoscenze riguardanti la sua fisiologia, e anche per la sua nota reattività ai contaminanti ambientali. I mitili vivono nell'interfaccia acqua/sedimento e filtrano un grande volume d'acqua, includendo il materiale sospeso e i colloidi (Gagnè et al., 2007); sono quindi adatti per indicare la contaminazione ambientale. Sono importanti dal punto di vista del monitoraggio ambientale marino in quanto assimilano le sostanze presenti nell'acqua nella quale vivono, risultando come "indicatori naturali" del livello di inquinamento marino. Sono organismi che presentano un'elevata tollerabilità ai fattori di stress ambientale, sia naturali che antropogenici, ed essendo organismi sessili permettono la valutazione complessiva del sito in cui vivono, mostrando l'effetto cumulativo di tutti gli elementi di stress a cui sono sottoposti; inoltre si possono utilizzare anche per somministrazioni dirette di inquinanti in laboratorio, in quanto sono facilmente allevabili ed il loro mantenimento è abbastanza semplice (Viarengo e Canesi, 1991).

Il sistema circolatorio è aperto, ed il liquido che circola nell'organismo è chiamato emolinfa. L'emolinfa è formata da cellule principali, gli emociti, che svolgono funzioni analoghe a quelle delle cellule immunitarie dei vertebrati e sono particolarmente indicati a studi sperimentali, in quanto rappresentano un sistema omogeneo, a differenza di altri tessuti quali il mantello, il piede o

le branchie, eterogenei a livello cellulare. Ciò rende la valutazione della loro risposta fisiologica più chiara e meno influenzata da fattori poco prevedibili.



Fig.3.1 Immagine di *Mytilus galloprovincialis*



Fig. 3.2 Immagine di *Mytilus galloprovincialis* di allevamento

3.1.1 ANIMALI UTILIZZATI PER L'ESPERIMENTO

I campioni di *M. galloprovincialis* sono stati raccolti dai pescatori della Cooperativa Copr.al.mo di Cesenatico in siti di qualità nel Mar Adriatico. Gli animali sono stati acclimatati per tre giorni in vaschette contenenti 60 L di acqua di mare aerata (1 animale per litro acqua di mare), sottoposti a un fotoperiodo naturale e alimentati una volta al giorno con un algal slurry (Koral filtrator, Xaqua, Italy). Dopo tre giorni i mitili sono stati poi esposti a diverse concentrazioni dei farmaci prescelti e della loro miscela, questo perché in ambiente i farmaci sono presenti mescolati con altri contaminanti, per esempio altri farmaci (Santos *et al.*, 2010).

3.2 ESPOSIZIONE *IN VIVO* DEI MITILI AL TRATTAMENTO COI FARMACI

I farmaci utilizzati nella presente Tesi sono la fluoxetina (*RS*)-*N*-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenossi]-propan-1-ammina, e il propranololo, 1-naftalen-1-ilossi-3-(propan-2-ilammino)propan-2-olo cloridrato (purezza \geq 98%). Entrambe le sostanze sono state acquistate da Sigma Aldrich (Milano, Italia).

Ai fini del presente studio, i mitili sono stati sottoposti per sette giorni a quattro condizioni sperimentali differenti: controllo, fluoxetina (FX), propranololo (PROP) e la miscela dei due farmaci (FX+PROP).

Le concentrazioni di FX e di PROP sono state scelte tenendo conto dei dati in letteratura riportanti le concentrazioni dei due farmaci in vari sistemi acquatici. Le concentrazioni di FX e PROP sono state descritte nel capitolo 2.6, paragrafo 2.6.1 e 2.6.2, rispettivamente.

Pertanto le concentrazioni scelte per gli esperimenti sono: 0,3 ng/L di FX, 0,3 ng/L di PROP, la somma delle due concentrazioni nella miscela FX+PROP.

Per ogni condizione sperimentale, sono state previste 3 vasche, ed ognuna di queste conteneva 12 mitili in 12 litri di acqua di mare. Gli animali sono stati mantenuti in condizioni di ossigenazione e temperatura costante (16°C).

I mitili sono stati alimentati con algal slurry (Koral filtrator, Xaqua, Italy), alimento specifico per animali filtratori, una volta al giorno, contemporaneamente alla somministrazione dei farmaci. L'acqua nelle vasche è stata cambiata una volta ogni 48 ore.

3.3 PREPARAZIONE DEGLI EMOCITI PER GLI ESPERIMENTI *IN VITRO* E TRATTAMENTI SPERIMENTALI

Per ogni esperimento, l'emolinfa è stata estratta da circa 50 animali con una siringa, combinata in un unico pool. Successivamente, aliquote di emolinfa da 1 mL sono state trasferite in piastre Petri da 35 mm di diametro (Nunc), e lasciate incubare a 16°C per 30 minuti per permettere agli emociti di aderire al fondo della piastra. Al termine dell'incubazione il liquido è stato sostituito con un opportuno volume di acqua di mare sterile. L'avvenuta adesione delle cellule è stata controllata al microscopio ottico.

Gli emociti sono stati quindi esposti a due gruppi di trattamenti.

I° GRUPPO. Esposizione a serotonina (5HT) e propranololo (PROP). Gli emociti sono stati esposti per 60 minuti a 5HT 1 μ M in presenza o meno di una pre-incubazione di 15 minuti con l'antagonista recettoriale PROP 100 μ M. In parallelo, emociti di controllo sono stati mantenuti nelle stesse condizioni sperimentali degli emociti esposti ai diversi trattamenti. Sia 5HT che PROP sono state preparate da soluzioni stock preparate in acqua.

II° GRUPPO. Esposizione a dBAMPc e H89. Gli emociti sono stati esposti per 4 ore a dBAMPc 100 μ M in presenza o meno di una pre-incubazione di 30 minuti con l'inibitore H89 10 μ M. In parallelo, emociti di controllo sono stati mantenuti nelle stesse condizioni sperimentali degli emociti esposti ai diversi trattamenti. Il dBAMPc è stato sciolto in acqua distillata, mentre H89 in DMSO; quindi la concentrazione finale del DMSO è pari allo 0.01% v/v.

Per ciascun gruppo sono stati effettuati tre esperimenti indipendenti in cui sono state utilizzate 3 piastre Petri per condizione sperimentale per parametro biologico da analizzare.

3.4 VALUTAZIONE DI ALTERAZIONI DI PARAMETRI CORRELATI ALLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE INTRACELLULARE

3.4.1 LIVELLI DI AMP CICLICO

Il dosaggio dei livelli di AMP ciclico è stato effettuato mediante un saggio quantitativo immunoenzimatico (*saggio ELISA*) utilizzando il kit DetectX® Direct Cyclic AMP (cAMP) Immunoassay kit (Temaricerca).

Per i campioni di tessuto, il saggio è stato effettuato su campioni di ghiandola digestiva e di mantello di sei mitili per ogni trattamento. Circa 50 mg di tessuto sono stati omogenati in 500 μ L di acido tri-cloroacetico 6% (peso/volume) e centrifugati per 15 minuti a 2000 $\times g$ a 4°C. Sono stati

prelevati i sovranatanti acquosi, che sono stati sottoposti a 4 lavaggi con etere dietilico (rapporto 1:4), e quindi portati ad essiccazione.

Per i campioni di cellule, alla fine di ciascun esperimento le cellule sono state lavate con circa 500 μ L di acqua di mare sintetica, e quindi lisate incubando per circa 30 minuti in ghiaccio con 250 μ L di ETOH al 65%. Il lisato è stato quindi centrifugato per 15 minuti a 2000 xg a 4°C, e il sovranatante è stato portato ad essiccazione.

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). La quantità di AMPc misurata nei tessuti di mitilo è espressa come pmolAMPc/g di tessuto (peso fresco), mentre quella misurata nelle cellule è stata espressa come pmolAMPc/mg di proteine totali. La quantità di proteine totali, presente nei campioni è stata misurata mediante il metodo di Lowry (*Lowry et al.*, 1951).

3.4.2 ATTIVITÀ DELLA PROTEINA CHINASI AMPc-DIPENDENTE (PKA)

I campioni della ghiandola digestiva e del mantello sono omogeneizzati a 4°C con una opportuna soluzione tampone di estrazione della PKA 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. Per i campioni di emociti derivanti dagli esperimenti in vitro, le cellule sono state lisate con 250 μ L di tampone di estrazione della PKA per ciascuna Petri. I campioni 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.

Per quantificare l'attività della PKA si è utilizzato il kit PepTag® Non-Radioactive cAMP-Dependent Protein Kinase Assay (Promega). Questo metodo utilizza un peptide fluorescente (KemptidePepTAG A1 Peptide) altamente specifico per la chinasi in questione. Quando la PKA fosforila il substrato fornito dal kit, la carica netta del peptide è alterata da +1 a -1 (Fig. 3.3) In questo modo, sottoponendo i campioni a un'elettroforesi orizzontale su gel d'agarosio, la frazione di peptide fosforilato migrerà al polo opposto rispetto a quella non fosforilata (Fig. 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).

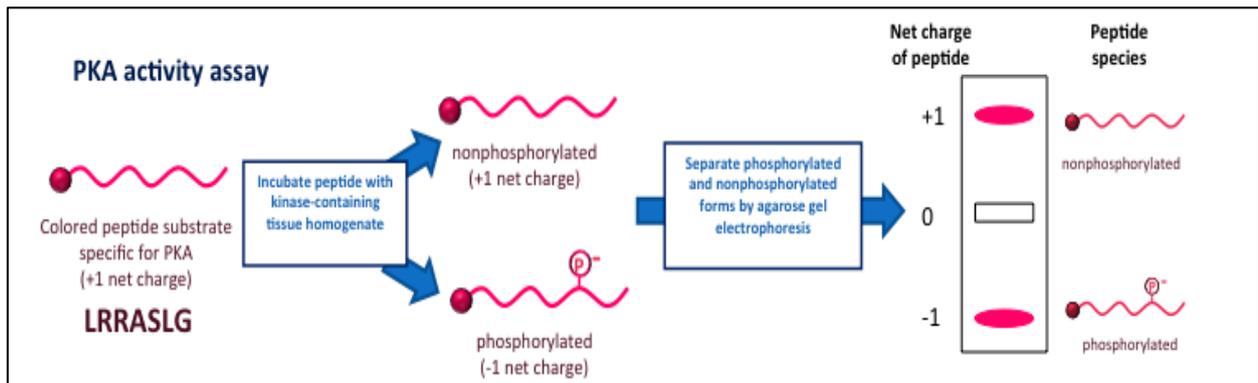


Fig. 3.3 Schema del saggio per l'attività della PKA (adattato dal manuale di istruzione del kit PepTagAssay, Promega)



Fig. 3.4 Esempio di separazione delle bande corrispondenti al peptide fosforilato e non fosforilato

3.5 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DEL GENE ABCB1 MEDIANTE PCR SEMI-QUANTITATIVA *REAL TIME*

3.5.1 ESTRAZIONE DELL'RNA

Per i campioni di tessuto, l'RNA totale è stato ottenuto da circa 100 mg di ghiandola digestiva o di mantello prelevati da mitili esposti ai diversi trattamenti e da quelli di controllo. Il metodo di estrazione seguito è quello descritto da *Chomczynski e Sacchi* (1987) e prevede l'utilizzo del reagente Trizol (Life Technologies). Per i campioni di emociti, invece, è stato utilizzato il kit Charge Switch total RNA cell kit (Life Technologies), appositamente studiato per l'estrazione di RNA da cellule, seguendo le istruzioni fornite.

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

La retrotrascrizione è quella reazione che consente di ottenere da un filamento stampo di RNA, una molecola di DNA a singolo filamento ad esso complementare (cDNA). Questa reazione è catalizzata da trascrittasi inversa (o DNA polimerasi RNA-dipendente), un enzima che si serve del filamento di RNA come stampo, polimerizzando nel filamento di sintesi i deossinucleotidi-trifosfato (dNTPs) complementari alla sequenza del filamento stampo. 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.

Per ogni campione, il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 μ g 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 minuti);
- inattivazione dell'enzima (70°C → 10 minuti).

I campioni di cDNA così ottenuti sono stati conservati a -20°C e utilizzati nella successiva fase di amplificazione.

3.5.3 LA PCR real time

La reazione a catena della DNA polimerasi (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) consente l'amplificazione di specifici frammenti di acidi nucleici, ossia la produzione *in vitro* di un elevato numero di copie di una specifica sequenza di DNA. Tale metodologia fu messa a punto nel 1983 da Kary B. Mullis il quale ottenne, per questo, il premio Nobel per la chimica nel 1993. La PCR si basa sulle proprietà dell'enzima DNA polimerasi di ripetere *in vitro* ciò che accade normalmente *in vivo* durante il processo di duplicazione del DNA, ossia la sintesi di nuovi filamenti complementari ad un filamento stampo, e sulla possibilità di mirare tale sintesi ad uno specifico tratto di DNA

scegliendo opportunamente gli inneschi o primers. Tutto ciò ha lo scopo di rendere disponibili elevate quantità di materiale genetico per future applicazioni in tempi relativamente brevi.

Il processo è svolto in natura dall'enzima DNA Polimerasi, che è in grado di sintetizzare progressivamente un nuovo segmento di DNA in presenza di un filamento di acido nucleico denaturato, di nucleotidi da polimerizzare, e di giuste condizioni di temperatura e pH. Per iniziare questa reazione è necessaria la presenza di opportuni primers, oligonucleotidi sintetici lunghi 10-30 pb, complementari alle regioni fiancheggianti il frammento genico da amplificare. I primers, appaiandosi a queste regioni, costituiscono un piccolo tratto di DNA a doppia catena, dal quale la DNA-polimerasi può iniziare la sintesi, ossia la formazione di legami fosfodiesterici tra l'estremità 3' del segmento iniziatore e quella 5' del deossinucleotidtrifosfato (dNTP) complementare allo stampo.

La reazione di PCR consiste nella ripetizione di diversi cicli termici (25-35), ognuno dei quali è costituito da tre fasi:

1. denaturazione: separazione dei due filamenti che costituiscono la doppia catena del DNA stampo per riscaldamento a 90-98°C.
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 questa tesi l'analisi del profilo di espressione del gene ABCB1 codificante per la P-glicoproteina di mitilo è stata condotta mettendo a punto un protocollo di PCR quantitativa *real time*. 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. La rilevazione quantitativa dell'amplificato può essere effettuata utilizzando diversi metodi per correlare l'incremento della fluorescenza emessa dal *reporter* alla quantità di amplificato prodotto. Il metodo impiegato in questa Tesi si basa sull'utilizzo del SYBR Green I, un agente intercalante in grado di

emettere fluorescenza quando si lega in corrispondenza del solco minore della doppia elica di DNA. L'incremento di intensità della fluorescenza emessa ad ogni ciclo è espresso in un grafico che ricostruisce la cinetica della reazione di PCR (Fig. 3.5). Da questo grafico vengono quindi estrapolati i parametri necessari per la quantificazione. In particolare, si definisce ciclo soglia (Ct) il ciclo in cui si osserva un aumento statisticamente significativo nel segnale di fluorescenza rilevato al di sopra del valore di fondo (Gibson *et al.* 1996). Il ciclo soglia è compreso durante la fase esponenziale dell'amplificazione. Maggiore è la quantità iniziale del cDNA bersaglio, più velocemente sarà accumulato il prodotto di PCR, minore sarà il valore di Ct rilevato.

Per gli scopi di questa Tesi è stato impiegato un protocollo di quantificazione relativo, prevede l'analisi di un controllo endogeno che viene utilizzato per la normalizzazione e la quantificazione relativa del gene bersaglio. Il controllo endogeno impiegato è il 18S rRNA (Dondero *et al.*, 2005).

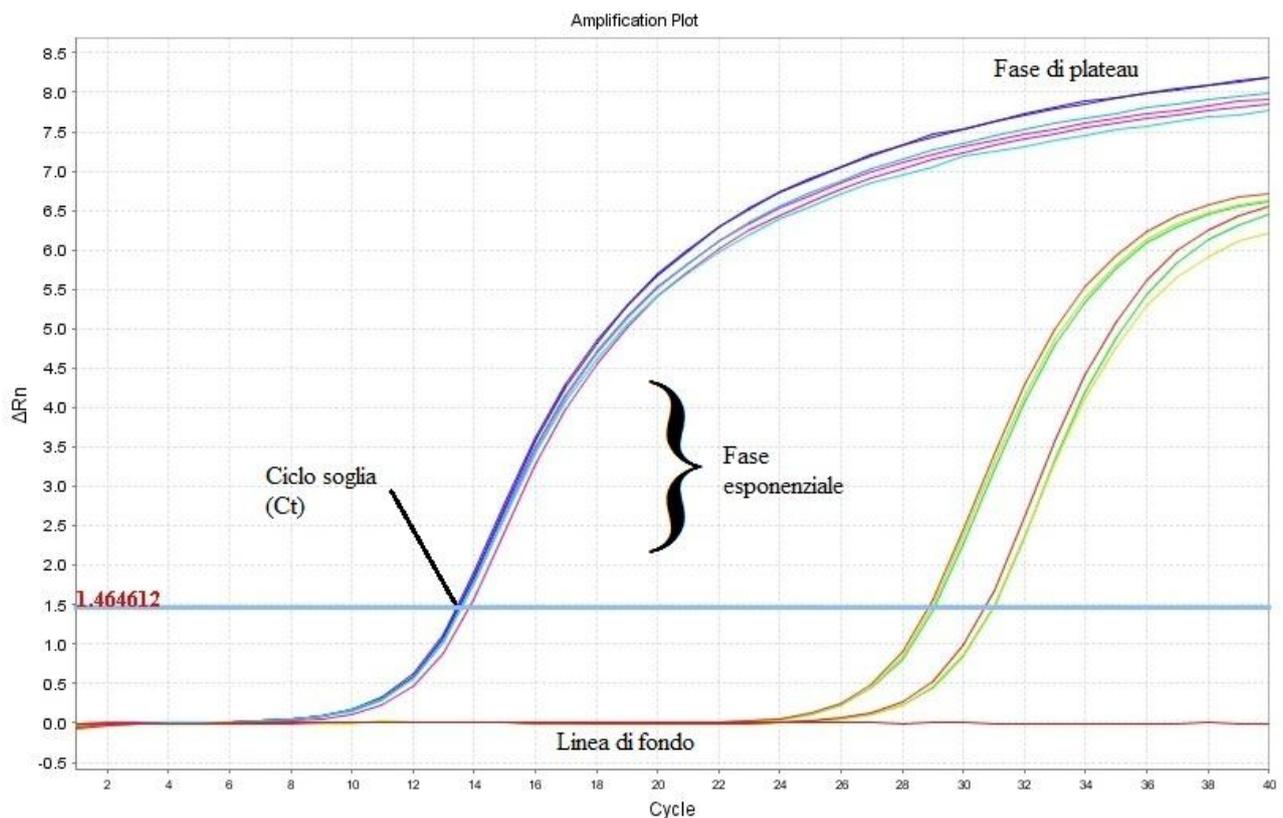


Fig. 3.5 Schema raffigurante la cinetica di reazione in una PCR *real time*. La linea rossa rappresenta il valore di fondo della fluorescenza, la linea azzurra è la soglia oltre la quale la fluorescenza del campione è significativa rispetto al valore di fondo, le linee blu e verdi rappresentano l'amplificazione 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

Per l'amplificazione del gene bersaglio, è stata costruita coppia di primers specifica per il trascritto corrispondente al gene ABCB1 di mitilo sulla base di una sequenza parziale ottenuta precedentemente per *Mytilus galloprovincialis* (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*. La specificità dei primers utilizzati per *Mytilus galloprovincialis* è stata verificata sequenziando i prodotti di amplificazione ottenuti (Franzellitti e Fabbri, 2006). Le sequenze dei primers specifici per il 18S sono riportate da Dondero *et al.* (2005).

La miscela di reazione è costituita da: la Fast Sybr Green *master mix* (Life Technologies) 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. Le reazioni sono state condotte in un sistema per PCR *real time* del tipo StepOne (Life Technologies), impiegando i parametri termici standard per la *master mix* utilizzata.

I risultati relativi alle variazioni di espressione del gene ABCB1 sono espressi in termini di rapporti d'induzione (*Fold change*) rispetto al controllo sperimentale normalizzati sul controllo endogeno 18s rRNA. 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 (2001); 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 al controllo endogeno 18s rRNA:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gene bersaglio}) - Ct (18s \text{ rRNA})$$

- 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 ed è stata valutata dalla pendenza di una curva di regressione costruita dai valori di Ct ottenuti da reazioni condotte con diluizioni in serie dei medesimi campioni di cDNA (Fig. 3.6). L'efficienza media ottenuta per il gene bersaglio ABCB1 di mitilo è pari al 100%, mentre per il controllo endogeno 18S rRNA è stata ottenuta una efficienza media pari al 92%.

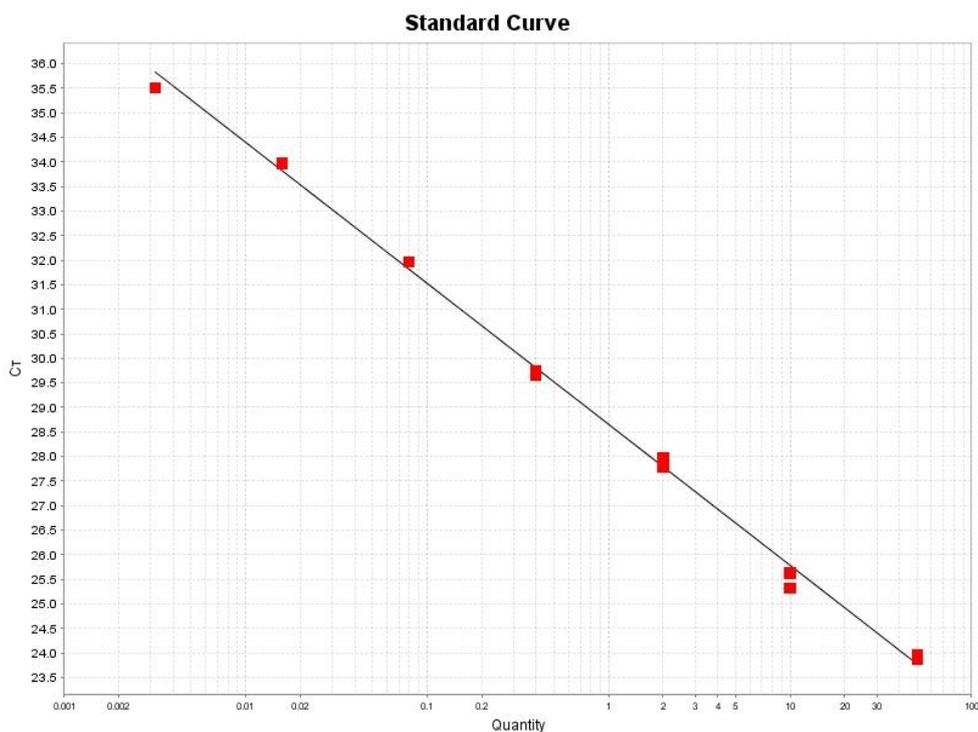


Fig. 3.6 Esempio di curva standard per il calcolo dell'efficienza della reazione di PCR real time

3.6 ANALISI STATISTICA

Per gli esperimenti in vivo, tutti i parametri biologici sono stati analizzati utilizzando 2 mitili per ciascuna delle 3 vasche per condizione sperimentale. I dati sono espressi come media \pm SEM dei valori medi ottenuti per ciascuna vasca. Per gli esperimenti in vitro, i dati sono espressi come media \pm SEM dei valori medi ottenuti per ciascuno dei 3 esperimenti indipendenti. La significatività dei risultati è stata testata attraverso il software SigmaStat mediante analisi della varianza a 1 seguita dal test di Bonferroni per i confronti tra coppie di gruppi di dati. Le differenze sono considerate statisticamente significative per $p < 0.05$.

Utilizzando il software STATISTICA ver 7.0 è stata anche effettuata un'analisi delle componenti principali (*principal component analysis*, PCA) per rilevare eventuali effetti interattivi dei farmaci FX e PROP sui parametri biologici analizzati nei mitili esposti *in vivo* ai due farmaci. La PCA, nota anche come decomposizione del valore singolo, è una tecnica di scomposizione che partendo dagli andamenti delle singole variabili in esame al variare delle condizioni sperimentali (o trattamenti), produce un set di andamenti prevalenti, le componenti principali, ciascuno dei quali rappresenta una frazione della variabilità totale osservata, ossia le direzioni principali di variazione tra i diversi trattamenti. Queste direzioni, o assi, conterranno generalmente i contributi provenienti da

trattamenti multipli, in modo tale che il raggruppamento tenga conto non solo degli effetti principali, ma anche delle interazioni tra trattamenti.

4. RISULTATI

4.1. EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE *IN VIVO* DEI MITILI ALLA FLUOXETINA, AL PROPRANOLOLO E ALLA LORO MISCELA.

Vengono di seguito riportati i grafici relativi ai livelli di AMPc, all'attività di PKA e all'espressione genica del trasportatore di membrana Pgp nelle ghiandole digestive e nei mantelli di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) esposti per sette giorni a 0.3 ng/L di fluoxetina (FX), 0.3 ng/L di propranololo (PROP), o alla miscela dei due farmaci (0.3 ng/L FX + 0.3 ng/L PROP).

4.1.1. VARIAZIONE DEI LIVELLI DI AMP CICLICO(AMPc)

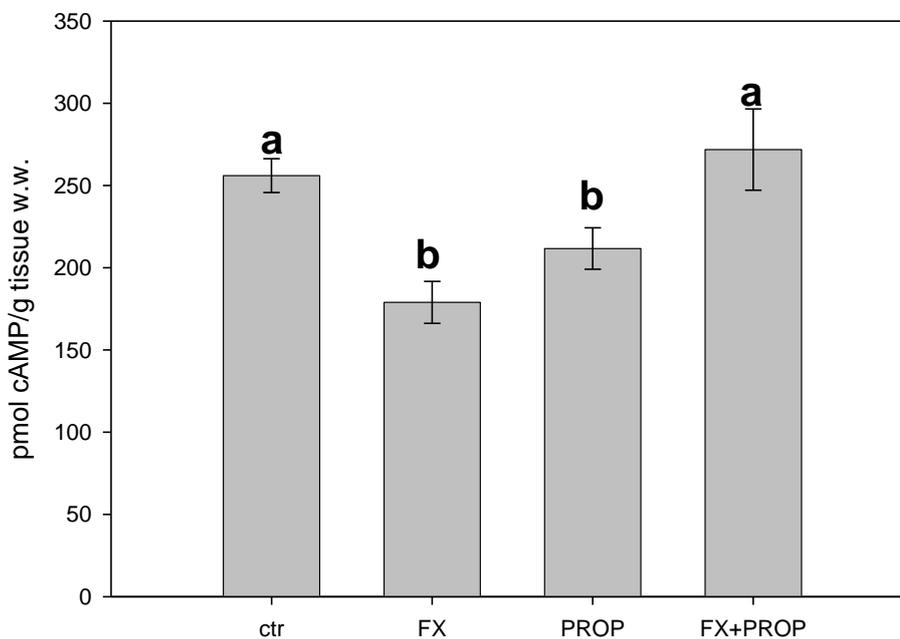


Fig. 4.1 Livelli di AMP ciclico misurati nelle ghiandole digestive dei mitili esposti a fluoxetina (FX), propranololo (PROP) e alla miscela dei due farmaci (FX+PROP). In parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. I dati rappresentano la media \pm ES (n = 3) dei livelli misurati espressi come pmol AMPc/g di tessuto (peso fresco). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Nelle ghiandole digestive dei mitili trattati con FX e PROP è stata osservata una significativa riduzione dei livelli di AMPc rispetto ai mitili di controllo; i livelli di AMPc misurati nei mitili esposti alla miscela FX+PROP non sono significativamente diversi rispetto al controllo, ma risultano significativamente più elevati rispetto a quelli dei mitili esposti ai singoli farmaci (Fig. 4.1).

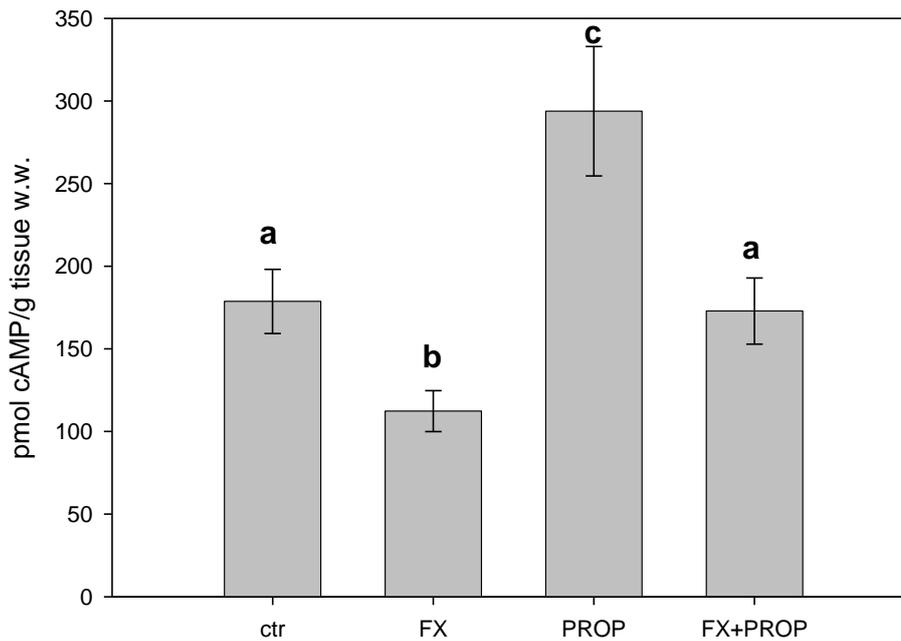


Fig. 4.2 Livelli di AMP ciclico misurati nel mantello dei mitili esposti a fluoxetina (FX), propranololo (PROP) e alla miscela dei due farmaci (FX+PROP). In parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. I dati rappresentano la media \pm ES (n = 3) dei livelli misurati espressi come pmol AMPc/g di tessuto (peso fresco). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Anche nel mantello si è potuta osservare una significativa riduzione dei livelli di AMPc nei mitili esposti a FX rispetto ai valori di controllo (Figura 4.2); negli organismi esposti a PROP i livelli di AMPc sono significativamente più elevati rispetto al controllo, mentre nei mitili esposti alla miscela FX+PROP non si è osservata alcuna variazione significativa (Fig. 4.2).

4.1.2. ATTIVITÀ DELLA PROTEINA CHINASI A (PKA)

Nella ghiandola digestiva è stata osservata una riduzione significativa dell'attività dell'enzima PKA rispetto ai controlli in tutte le condizioni sperimentali (Fig. 4.3).

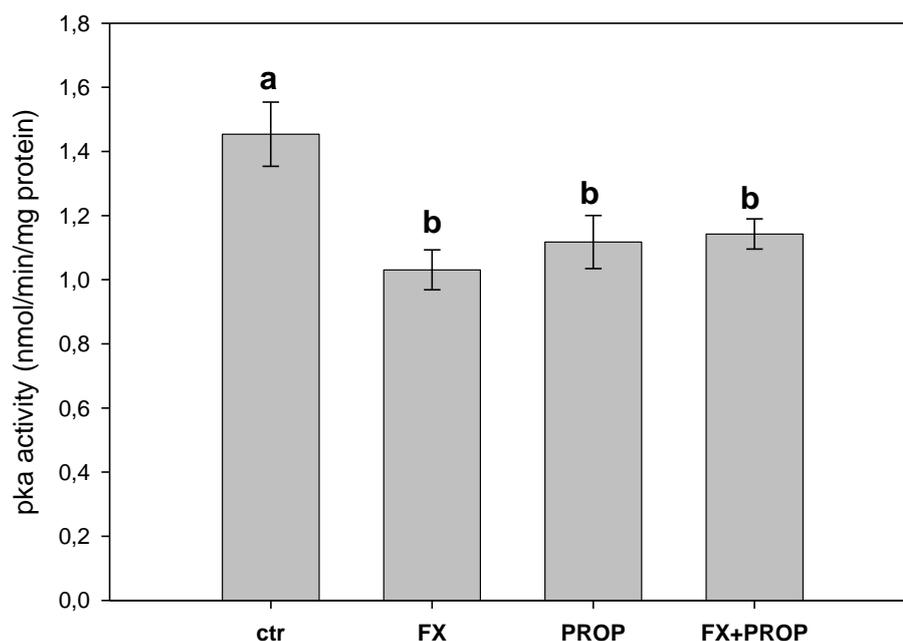


Fig. 4.3 Attività della PKA valutata nella ghiandola digestiva dei mitili esposti a fluoxetina (FX), propranololo (PROP) e alla miscela dei due farmaci (FX + PROP). In parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. I dati rappresentano la media \pm ES (n = 3) dei livelli misurati espressi come pmol AMPc/g di tessuto (peso fresco). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

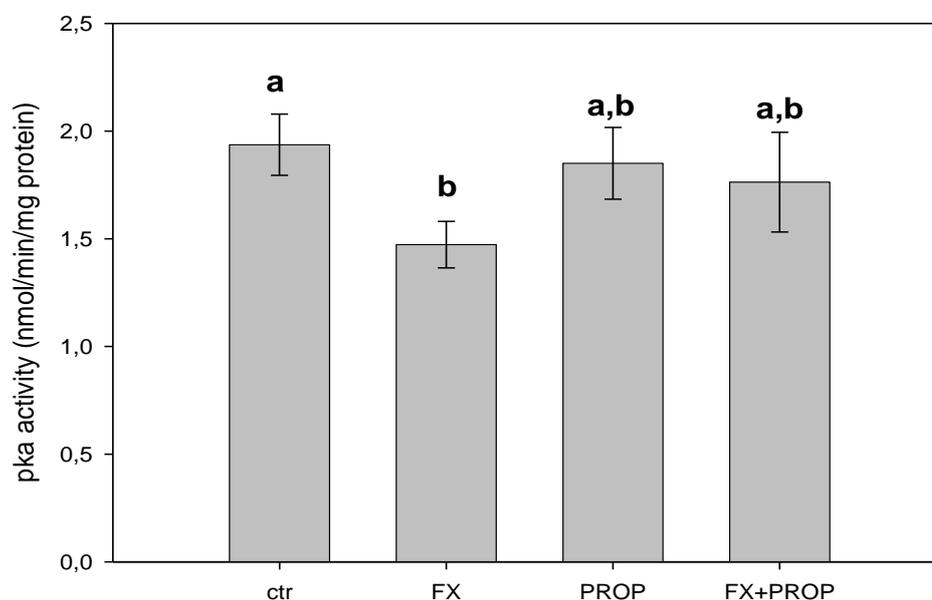


Fig. 4.4 Attività della PKA valutata nel mantello dei mitili esposti a fluoxetina (FX), propranololo (PROP) e alla miscela dei due farmaci (FX + PROP). In parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. I dati rappresentano la media \pm ES (n = 3) dei livelli misurati espressi come pmol AMPc/g di tessuto (peso fresco). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Nel mantello, l'attività della PKA è significativamente inferiore nei mitili trattati con FX rispetto ai mitili di controllo, mentre non si osservano variazioni significative nei mitili esposti a PROP o alla miscela FX+PROP(Fig. 4.4).

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

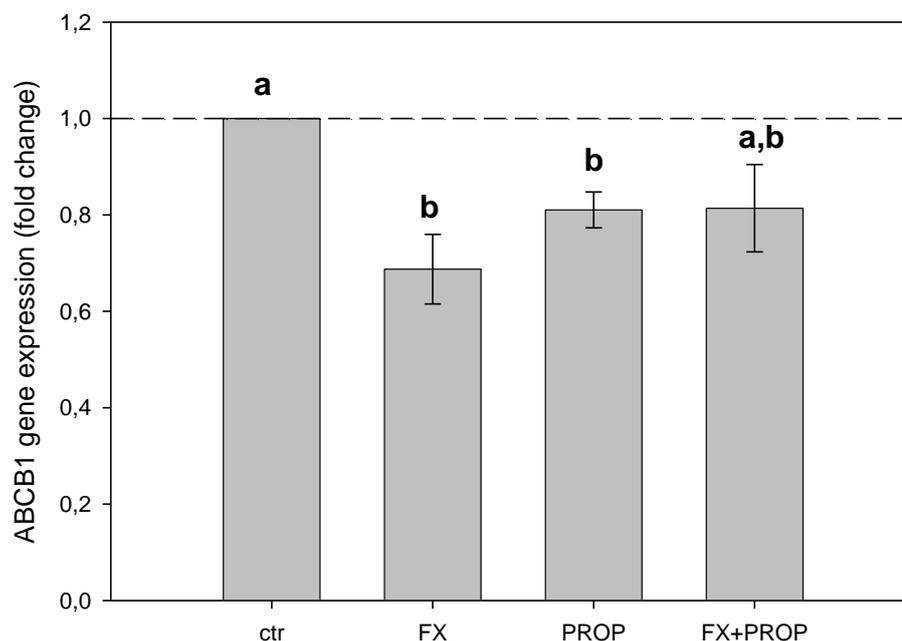


Fig. 4.5 Variazioni dei livelli di espressione del gene ABCB1 nella ghiandola digestiva dei mitili esposti a fluoxetina (FX), propranololo (PROP) e alla miscela dei due farmaci (FX + PROP). In parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. L'espressione genica è stata valutata mediante *real time* PCR secondo quanto riportato nei materiale e metodi. I livelli di espressione per il gene ABCB1 sono stati normalizzati su quelli del 18S rRNA, che è stato utilizzato come controllo endogeno. I dati sono stati espressi come la media \pm ES dei rapporti di induzione rispetto al controllo(N=3). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

L'espressione del gene ABCB1 che codifica per il trasportatore di membrana P-glicoproteina (Pgp) di mitilo è stata valutata nella ghiandola digestiva e nel mantello dei mitili esposti alle varie condizioni sperimentali mediante un protocollo di PCR quantitativa *real time* messo a punto nell'ambito di questo lavoro di Tesi utilizzando una sequenza parziale del gene in esame specifica per la specie *Mytilus galloprovincialis* (Numero di accesso in GenBank: EF057747; Franzellitti e

Fabbri, 2006). Nella ghiandola digestiva il gene ABCB1 è significativamente sotto-espresso rispetto ai valori di controllo nei mitili esposti a FX o PROP, mentre non ci sono variazioni significative negli organismi esposti alla miscela FX+PROP (Fig. 4.5).

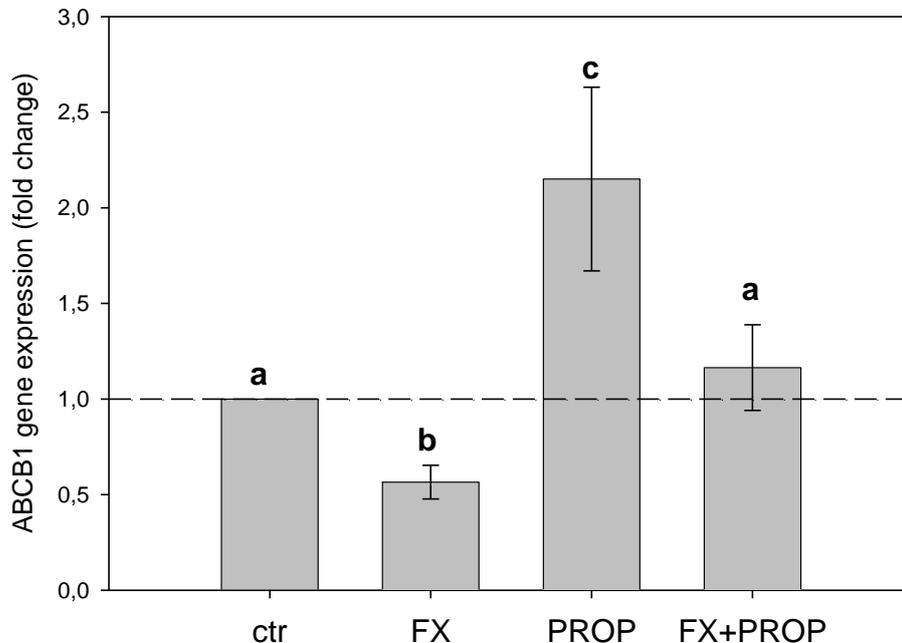


Fig. 4.6 Variazioni dei livelli di espressione del gene ABCB1 nel mantello dei mitili esposti a fluoxetina (FX), propranololo (PROP) e alla miscela dei due farmaci (FX+PROP). In parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. L'espressione genica è stata valutata mediante real time PCR secondo quanto riportato nei materiale e metodi. I livelli di espressione per il gene ABCB1 sono stati normalizzati su quelli del 18S rRNA, che è stato utilizzato come controllo endogeno. I dati sono stati espressi come la media \pm ES dei rapporti di induzione rispetto al controllo (N=3). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Nel mantello, l'espressione di ABCB1 risulta significativamente ridotta nei mitili trattati con FX e aumentata in quelli esposti a PROP rispetto ai mitili di controllo (Fig. 4.6). I livelli di espressione di ABCB1 rilevati nei mantelli dei mitili esposti alla miscela FX+PROP non sono significativamente diversi rispetto ai valori di controllo (Fig. 4.6).

4.1.4. ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI

L'analisi delle componenti principali (PCA) è una tecnica di scomposizione che permette di caratterizzare gli andamenti prevalenti delle variabili in esame al variare delle condizioni sperimentali; tali andamenti prevalenti sono appunto denominati *componenti principali*, ognuno dei quali rappresenta una frazione della variabilità totale osservata. Nel presente lavoro di Tesi la PCA è stata impiegata per comprendere se l'esposizione alla miscela FX+PROP è in grado di indurre nei mitili risposte biologiche significativamente diverse rispetto all'esposizione ai singoli farmaci. A tal fine, i dati riguardanti i parametri biologici analizzati nei due tessuti di mitilo sono stati raggruppati per condizione sperimentale (PCA sui trattamenti). I risultati sono riportati nella Figura 4.7 e 4.8. Nella ghiandola digestiva, sono state individuate due componenti principali che insieme rappresentano circa l'80% della variabilità totale osservata (Fig. 4.7). E' stata rilevata una evidente separazione fra il gruppo di campioni di controllo (ctr) e quelli esposti ai singoli farmaci e alla loro miscela. Il gruppo FX+PROP è ben separato dal gruppo di campioni esposti a FX, ma presenta un alto grado di similitudine con il gruppo di campioni esposti a PROP (Fig. 4.7). Anche nel mantello sono state individuate due componenti principali, che insieme rappresentano circa l'89,6% della variabilità totale osservata (Fig. 4.8). E' stata rilevata una evidente separazione fra il gruppo di campioni di controllo (ctr) e quelli esposti ai singoli farmaci (FX o PROP). Il gruppo di campioni esposti alla miscela FX+PROP è ben separato sia dal gruppo di campioni esposti a FX che da quelli esposti a PROP, ma presenta un alto grado di similitudine con il gruppo di campioni di controllo (Fig. 4.8).

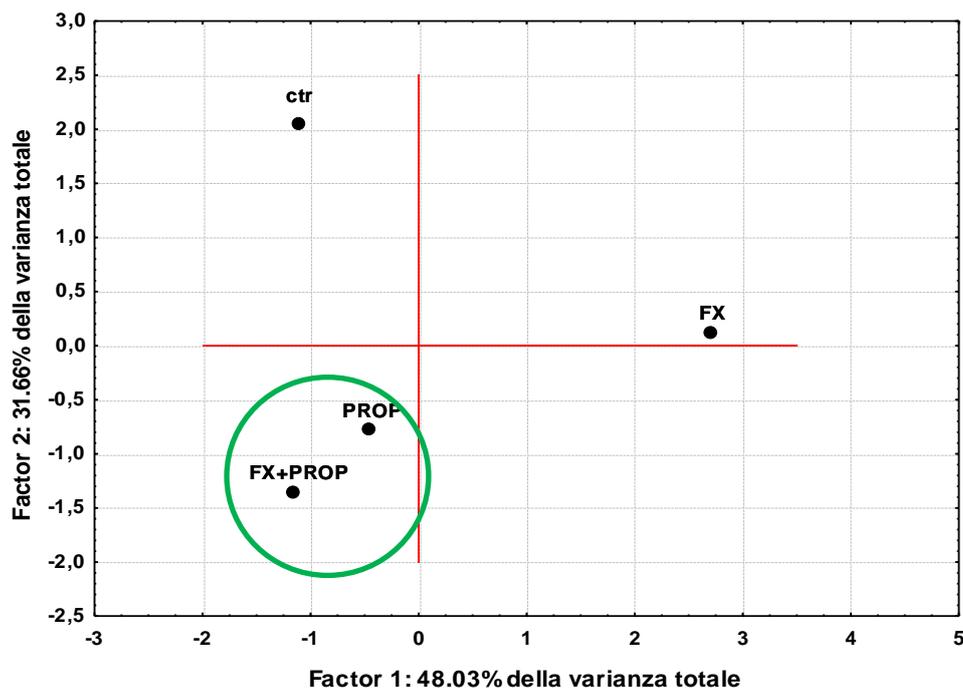


Fig. 4.7 Grafico bi-dimensionale che riporta la PCA analisi condotta sui parametri biologici (livelli di AMPc, attività della PKA, espressione del gene ABCB1) misurati in ghiandole digestive di mitilo e raggruppati secondo le condizioni sperimentali utilizzati nella presente Tesi: controllo (ctr), fluoxetina (FX), propranololo (PROP), miscela dei due farmaci (FX+PROP). I cerchi tratteggiati indicano i gruppi di trattamenti ad alto grado di similitudine.

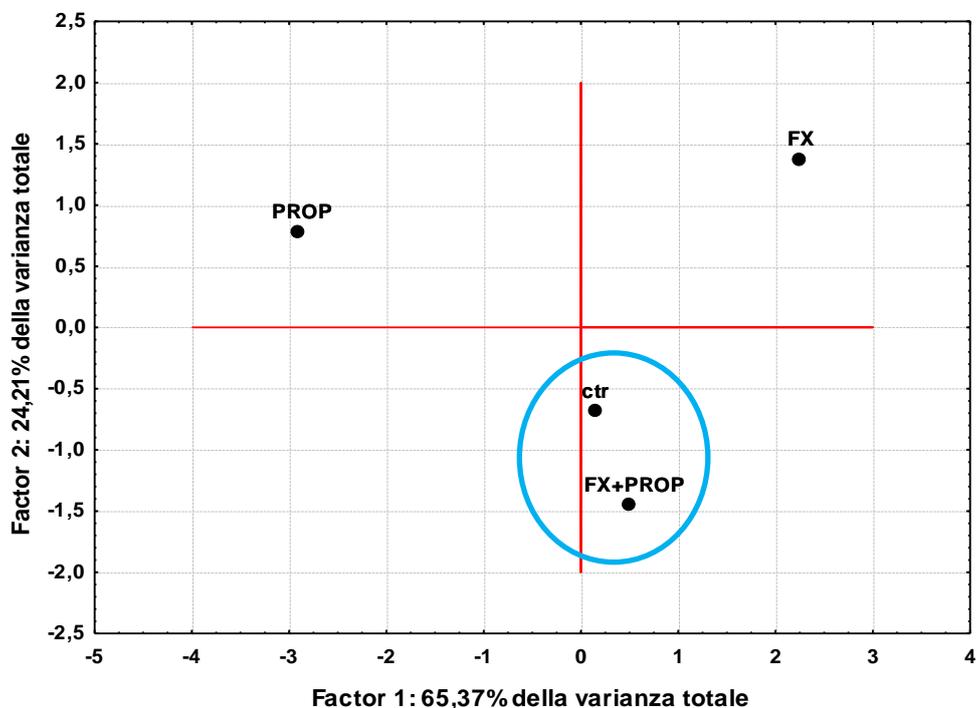


Fig. 4.8 Grafico bi-dimensionale che riporta la PCA analisi condotta sui parametri biologici (livelli di AMPc, attività della PKA, espressione del gene ABCB1) misurati in mantelli di mitilo e raggruppati secondo le condizioni sperimentali utilizzati nella presente Tesi: controllo (ctr), fluoxetina (FX), propranololo (PROP), miscela dei due farmaci (FX+PROP). I cerchi tratteggiati indicano i gruppi di trattamenti ad alto grado di similitudine.

4.2. EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE *IN VITRO* DI EMOCITI DI MITILO A SEROTONINA E PROPRANOLOLO

Abbiamo esposto *in vitro* emociti di mitilo alla serotonina (5HT), l'agonista del recettore 5HT, ed al propranololo (PROP), un antagonista degli stessi recettori, per comprendere meglio se il PROP interagisce con i recettori 5-HT₁ bloccando l'effetto della 5HT. Abbiamo utilizzato la 5HT proprio perché la FLX aumenta i livelli di intracellulari di questo neurotrasmettitore.

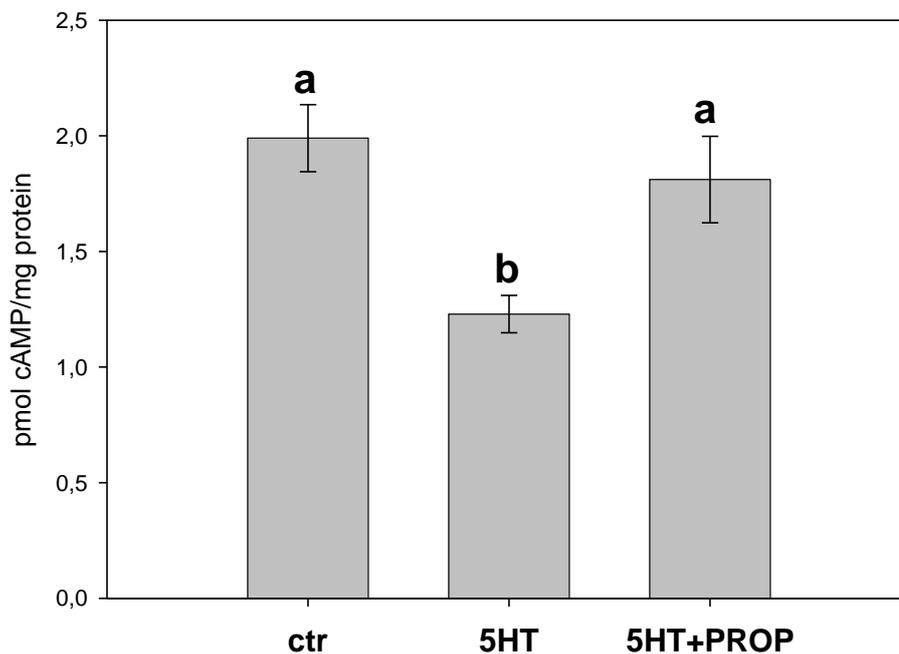


Fig. 4.9 Livelli di AMPc in emociti di mitilo esposti per 60 minuti a serotonina (5HT) 1 μ M in presenza o meno di una pre-incubazione di 15 min con l'antagonista recettoriale propranololo (PROP 100 μ M). In parallelo, emociti di controllo (ctr) sono stati mantenuti nelle stesse condizioni sperimentali degli emociti esposti ai diversi trattamenti. I dati rappresentano la media \pm ES (n = 3) dei livelli misurati espressi come pmol AMPc/mg proteine totali. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Rispetto agli emociti di controllo la 5HT provoca una significativa diminuzione dei livelli di AMPc, mentre nei campioni pre-incubati per 15 min con PROP e quindi co-esposti alla 5HT (5HT+PROP) non si osservano variazioni significative rispetto ai mitili di controllo (Fig. 4.9). Analogamente, sia l'attività della PKA che i livelli di espressione del gene ABCB1 sono significativamente ridotti nei campioni esposti a 5HT e non significativamente modificati rispetto al controllo nei campioni esposti a 5HT+PROP (Fig. 4.10-4.11).

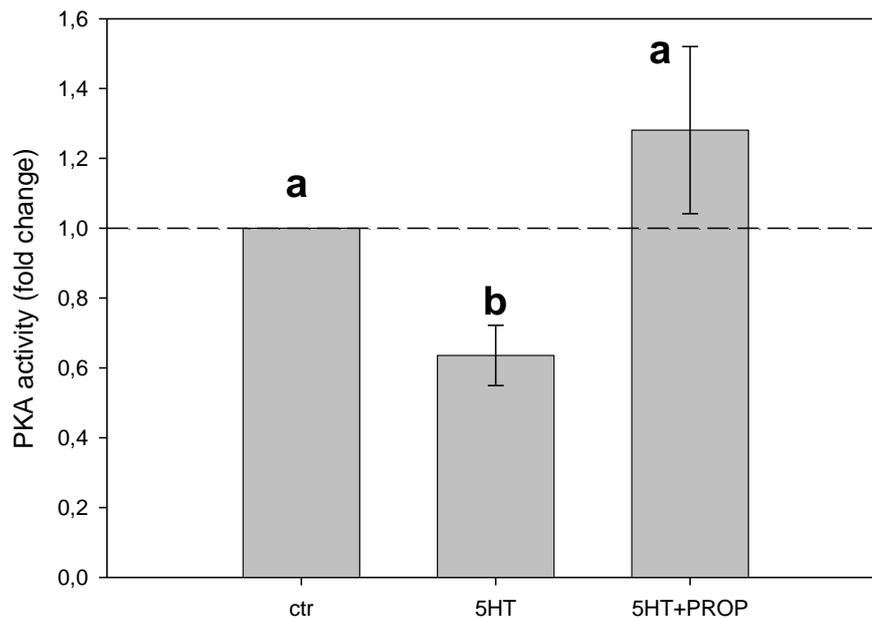


Fig. 4.10 Attività della PKA in emociti di mitilo esposti per 60 minuti a serotonina (5HT) 1 μ M in presenza o meno di una pre-incubazione di 15 min con l'antagonista recettoriale propranololo (PROP 100 μ M). In parallelo, emociti di controllo (ctr) sono stati mantenuti nelle stesse condizioni sperimentali degli emociti esposti ai diversi trattamenti. I dati sono espressi come media \pm ES della variazione rispetto al controllo (N=3 esperimenti indipendenti). L'attività basale media della PKA misurata nei campioni di controllo è pari a $1,05 \pm 0,18$ nmol/min/mg proteine. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

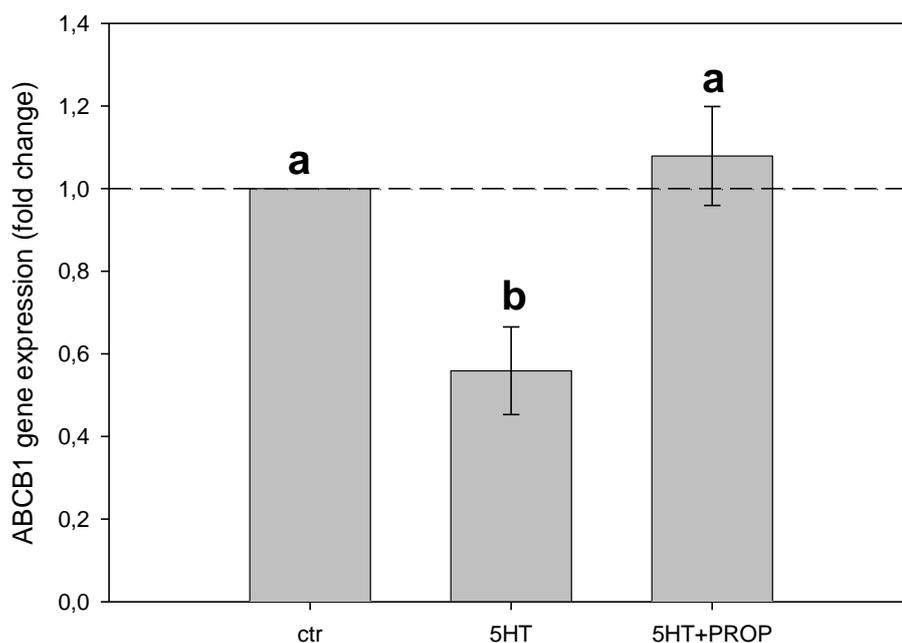


Fig. 4.11 Espressione del gene ABCB1 in emociti di mitilo esposti per 60 minuti a serotonina (5HT) 1 μ M in presenza o meno di una pre-incubazione di 15 min con l'antagonista recettoriale propranololo (PROP 100 μ M). In parallelo, emociti di controllo (ctr) sono stati mantenuti nelle stesse condizioni sperimentali degli emociti esposti ai diversi trattamenti. I dati sono espressi come media \pm ES della variazione rispetto al controllo (N=3 esperimenti indipendenti). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

4.3. EFFETTI DELL'ESPOSIZIONE *IN VITRO* DI EMOCITI DI MITILO AD ATTIVATORI E INIBITORI DELL'ATTIVITÀ DELLA PKA

Per comprendere se la modulazione dell'espressione del gene ABCB1 è mediata dall'AMPc e dalla PKA abbiamo esposto *in vitro* emociti di mitilo al dibutirilAMPc (dBAMPc), un analogo dell'AMPc attivatore specifico della PKA, e H89, un inibitore specifico della PKA.

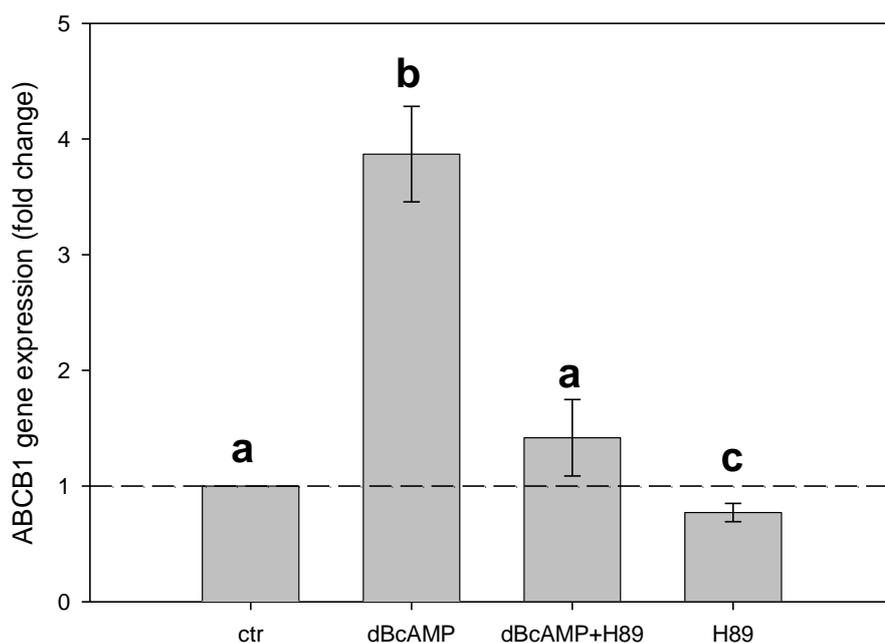


Fig. 4.13 Espressione del gene ABCB1 in emociti di mitilo esposti per 4 ore a dibutirilAMPc (dBAMPc) 100 μ M in presenza o meno di una pre-incubazione di 30 min con l'inibitore H89 10 μ M. In parallelo, emociti di controllo (ctr) sono stati mantenuti nelle stesse condizioni sperimentali degli emociti esposti ai diversi trattamenti. I dati sono espressi come media \pm ES della variazione rispetto al controllo (N=3 esperimenti indipendenti). Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

5. DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

I residui dei farmaci, sia ad uso umano che veterinario, sono presenti in ambiente in concentrazioni minime che vanno da ng a µg/L, risultando contaminanti emergenti largamente diffusi negli ecosistemi acquatici e terrestri (*Santos et al.*, 2010). Poiché continuamente introdotti e non efficacemente rimossi, i farmaci e i loro derivati sono da considerarsi pseudo-persistenti, e generano preoccupazione per la salute degli animali acquatici e un rischio teorico per chi si alimenta di tali organismi. Inizialmente il problema era limitato alle acque di scarico, mentre ora è noto che i farmaci sono ubiquitari nei fiumi e nei laghi e nelle acque marine costiere, e si trovano talvolta nell'acqua di falda così come in quella potabile (*Guerrero-Preston e Brandt-Rauf*, 2008). Studi ecotossicologici rivelano che gli effetti acuti su crostacei, alghe e larve di pesci sono provocati da concentrazioni di farmaci dell'ordine dei mg/L, mentre quelle misurate nelle acque è mediamente cento-mille volte inferiore (*Fent et al.*, 2006). Tuttavia, dati recenti mostrano che i farmaci si possono bioaccumulare ed avere effetti a lungo termine. Soprattutto occorre tener presente che i farmaci sono sintetizzati per produrre effetti biologici intensi ed avere come effetto collaterale una bassa tossicità acuta. Quindi non va escluso che effetti nocivi in specie non-bersaglio possano essere indotti anche a basse concentrazioni a fronte di un'esposizione ai farmaci a lungo termine e continua, se tali specie sono dotate di opportuni recettori conservati durante l'evoluzione. Tuttavia, potrebbero avere effetti inattesi se i bersagli molecolari sono conservati ma hanno una differente funzione. Inoltre, i farmaci manifestano effetti collaterali, in genere se usati a dosi elevate o per lungo tempo, e molto spesso si tratta di effetti ossidanti. E' possibile che tali effetti siano indotti dai farmaci ambientali negli organismi non bersaglio, magari a basse dosi se questi animali sono più sensibili dell'uomo o degli animali di allevamento.

In parallelo con un altro lavoro di tesi volto a studiare i possibili effetti aspecifici degli stessi farmaci, lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare i potenziali effetti indotti dalla fluoxetina (farmaco anti-depressivo), dal propranololo (farmaco anti-ipertensivo), o dalla loro miscela con riferimento alle interazioni specifiche con i bersagli molecolari utilizzati ai fini terapeutici. Questi studi non sono necessariamente semplici, in particolar modo se effettuati sugli invertebrati, in quanto molti aspetti della fisiologia di questi organismi non sono noti. Tuttavia proprio gli invertebrati sono largamente esposti ai farmaci. Il mitilo mediterraneo, *Mytilus galloprovincialis*, per esempio, è un organismo sessile che filtra enormi quantità di acqua ai fini respiratori ed alimentari includendo il materiale sospeso ed i colloidali (*Gagnè et al.*, 2007), ed è quindi particolarmente esposto ai farmaci presenti negli ambienti marini-costieri. Il mitilo è comunque particolarmente resistente ai fattori di stress ambientale, e perciò questa specie è ampiamente utilizzata come organismo sentinella nei comuni programmi di biomonitoraggio degli ambienti costieri e di transizione. Inoltre le conoscenze riguardanti la sua fisiologia sono sufficientemente

estese rispetto ad altri invertebrati.

Scopo di questa tesi è stato quello di verificare se concentrazioni ambientali dei farmaci fluoxetina e propranololo, o la loro miscela, possono interferire con i meccanismi di trasduzione del segnale su cui agiscono gli stessi farmaci a livello umano. In particolare, la fluoxetina è il principio attivo del Prozac®, un antidepressivo che inibisce a livello sinaptico il “reuptake” della serotonina, neurotrasmettitore con effetti importanti nei bivalvi (*Fabbri e Capuzzo.*, 2010). Ne risulta che in sua presenza una maggiore quantità di serotonina rimane nelle fessure sinaptiche, e si lega ai propri recettori determinando l’effetto biologico. Nei vertebrati sono noti 7 tipi di recettori per la serotonina (5HT₁₋₇), ma nei molluschi è stata dimostrata la presenza soltanto del recettore di tipo 5HT₁ (*Tierney, 2001*). Questo recettore è accoppiato alla proteina G inibitoria, che media l’inibizione dell’enzima adenilil ciclasi e la conseguente riduzione dei livelli di AMPc intracellulare. Il propranololo è un bloccante dei recettori β-adrenergici, e antagonizza gli effetti delle catecolamine fisiologiche che attraverso questi recettori attivano la proteina G stimolatrice, che media l’attivazione dell’enzima adenilil ciclasi e l’aumento dei livelli di AMPc intracellulare. Seppur in maniera meno efficace, nei mammiferi il propranololo è anche un bloccante dei recettori per la 5HT di tipo 1 (5HT₁). La miscela dei due farmaci, presente comunemente in ambiente, potrebbe produrre effetti indipendenti, oppure antagonisti o sinergici a seconda del reale effetto che essi hanno nei tessuti di mitilo.

Nell’uomo l’AMPc attraverso la proteina ad esso correlata, la proteina chinasi AMPc-dipendente (PKA), modula l’espressione di geni che codificano per la P-glicoproteina (Pgp), un trasportatore di membrana che estrude dalla cellula gli xenobiotici eventualmente entrati producendo quindi un effetto di citoprotezione (*Rohlf e Glazer, 1995*). Parte dello studio è stato dedicato a comprendere se i due farmaci influenzino l’espressione di questo gene, che avrebbe conseguenze proprio ai fini della detossificazione del mitilo dagli agenti xenobiotici, farmaci compresi.

In esperimenti preliminari condotti nel Laboratorio Fisiologia e Biochimica Ambientale si è osservato che la fluoxetina ed il propranololo riducono in maniera significativa la stabilità delle membrane lisosomiali, con effetti significativi già alle concentrazioni comprese nell’intervallo ambientale. In questa tesi i mitili sono stati esposti ad una particolare concentrazione dei due farmaci (0,3 ng/L) da soli o in combinazione, per il tempo di 7 giorni.

Tra i molti aspetti non conosciuti della fisiologia dei molluschi vi è il controllo della espressione del gene ABCB1, così come l’effettiva capacità del propranololo di bloccare il recettore 5HT₁. Infatti, se la presenza di questo recettore è stata dimostrata nei tessuti dei mitili sulla base di studi di

sequenziamento genico e successiva valutazione dell'espressione genica (*Cubero-Leon et al.*, 2010; *Barmo et al.*, 2011) la farmacologia è assai poco chiara. Gli studi *in vivo* non ci permettevano di scendere in questo dettaglio, e quindi abbiamo lavorato *in vitro* utilizzando emociti di mitilo isolati. Queste cellule costituiscono un sistema semplice e "pulito" rispetto a branchie, mantello o ghiandole digestive che sono formati da vari tipi di cellule.

Gli studi *in vivo* su tessuti di mitili esposti ai farmaci per 7 giorni hanno indicato che la fluoxetina causa una diminuzione statisticamente significativa dei livelli di AMPc, dell'attività della PKA e anche dell'espressione del gene ABCB1 rispetto al controllo, sia nel mantello che nella ghiandola digestiva. Questo risultato indica che il mitilo possiede i bersagli specifici su cui la fluoxetina agisce sull'uomo, evidentemente conservati durante l'evoluzione. In particolare, inibendo il *reuptake* della serotonina e aumentando la quantità di questo neurotrasmettitore all'esterno della cellula, la fluoxetina aumenta l'effetto di inibizione operato dalla serotonina sul sistema dell'AMPc. Questo effetto è mediato dalla presenza di recettori 5HT₁ espressi sia nelle ghiandole digestive che nel mantello dei mitili (*Cubero-Leon et al.*, 2010; *Barmo et al.*, 2011). Pertanto, il mitilo risulta sensibile a concentrazioni molto basse del farmaco ed è soggetto all'alterazione dei livelli di AMPc e delle funzioni fisiologiche ad esso correlate. L'AMPc è noto modulare fisiologicamente la contrazione muscolare, i movimenti delle ciglia branchiali, e la mobilità degli spermatozoi; inoltre stimola la glicogenolisi del mantello per fornire prodotti energetici alle gonadi durante il loro sviluppo (*Fabbri e Capuzzo*, 2010). La diminuzione dell'espressione del gene che codifica per la espressione di Pgp, attraverso cui le cellule estrudono all'esterno gli xenobiotici, espone l'organismo al loro attacco. La fluoxetina è quindi un potenziale inquinante con effetti sinergici con altre sostanze presenti in ambiente.

Nella ghiandola digestiva il propranololo alla concentrazione 0,3 ng/L provoca una significativa riduzione dei livelli di AMPc, dell'attività della PKA e dell'espressione del gene ABCB1 rispetto ai valori di controllo, in accordo con quanto riportato da *Franzellitti et al.* (2011). Nel mantello, invece, il propranololo aumenta in maniera significativa i livelli di AMPc e l'espressione del gene ABCB1, anche se non ha effetti sull'attività della PKA.

Questo differente effetto indotto dal propranololo nei due tessuti del mitilo fa ipotizzare una differente espressione di recettori adrenergici e serotoninergici fra i due tessuti, con un prevalente controllo adrenergico nella ghiandola digestiva, e un prevalente controllo serotoninergico nel mantello.

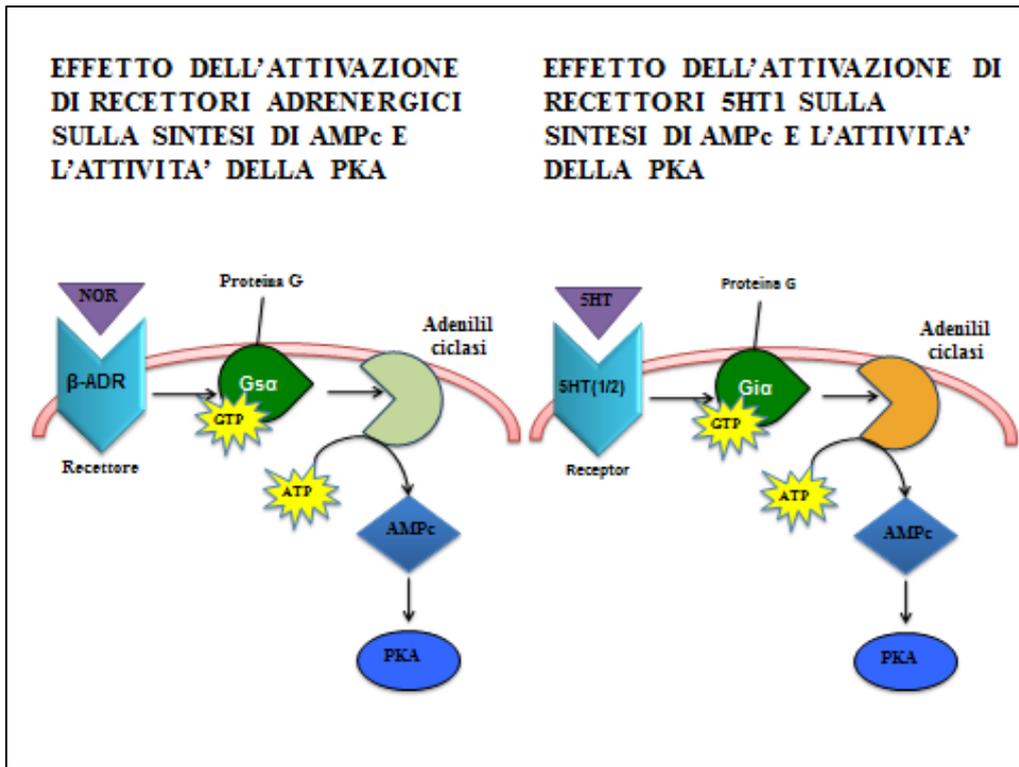


Fig. 5.1 Effetti dell'attivazione di recettori adrenergici e serotoninergici sulla sintesi di AMPc e l'attività della PKA

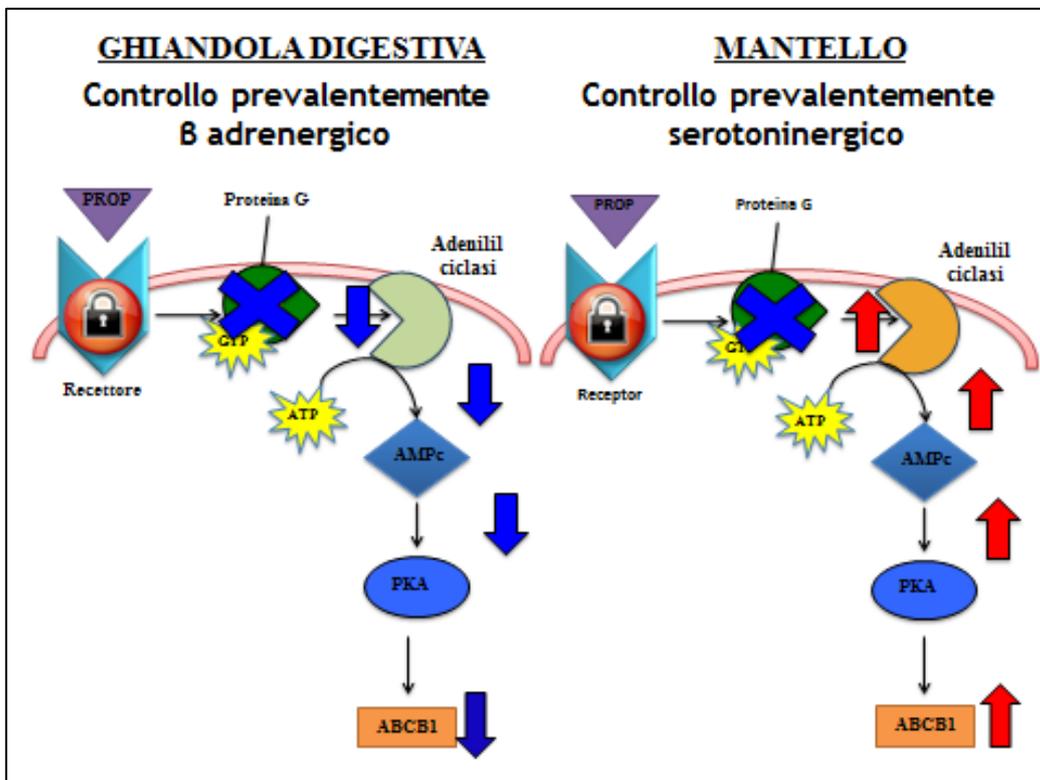


Fig. 5.2 Effetto del propranololo nella ghiandola digestiva e nel mantello del mitilo

Pertanto, l'effetto indotto dal propranololo nella ghiandola digestiva è dovuto alla sua azione da antagonista per i recettori adrenergici accoppiati alle proteine G che stimolano la sintesi di AMPc (proteine Gs). L'aumento dei livelli di AMPc osservato nel mantello, invece, può essere interpretato come un effetto antagonistico del propranololo sui recettori 5HT₁ accoppiati alle proteine G che hanno un'azione inibitoria sulla sintesi di AMPc (proteine Gi). Sebbene *Garnerot et al.* (2006) dimostri che le fibre serotoninergiche sono apparentemente assenti nella ghiandola digestiva e presenti in un'alta concentrazione nel mantello e nelle gonadi del mollusco bivalve *Mya arenaria*, nel mitilo RNA messaggeri codificanti per il recettore 5HT₁ sono espressi sia nella ghiandola digestiva che nel mantello (*Cubero-Leon et al., 2010; Barmo et al., 2011*). Pertanto, si può ipotizzare che sia l'espressione differente tra recettori adrenergici e serotoninergici nei due tessuti a svolgere un ruolo fondamentale nel determinare le risposte osservate.

Il propranololo quindi influisce sulla fisiologia del mitilo interagendo con importanti bersagli fisiologici, mediatori nell'uomo della sua azione terapeutica.

L'analisi delle componenti principali ha dimostrato come i due farmaci somministrati congiuntamente mostrino evidenti effetti interattivi sui parametri analizzati nella presente Tesi, soprattutto nel mantello dei mitili. In questo tessuto, infatti, il propranololo, agisce sui recettori 5HT₁, antagonizza gli effetti dell'aumento dei livelli extracellulari di serotonina indotto dall'azione della fluoxetina, e pertanto tutti i parametri analizzati risultano non significativamente alterati rispetto ai valori di controllo, risultato che si discosta sensibilmente dalla generale sovra-attivazione (PROP) e sotto-attivazione (FX) ottenuta a seguito dell'esposizione ai singoli composti. Nella ghiandola digestiva, invece, l'effetto netto dell'esposizione alla miscela dei farmaci è complicato dal fatto che mentre la fluoxetina può agire sul sistema AMPc/PKA solo attraverso l'aumentata attività dei recettori 5HT₁ dovuta all'aumento dei livelli extracellulari di serotonina, il propranololo può agire sia antagonizzando i recettori 5HT₁ che antagonizzando i recettori adrenergici. Sotto l'ipotesi che il controllo prevalente nella ghiandola digestiva sia mediato dai recettori adrenergici, gli effetti indotti sui livelli di AMPc, sull'attività della PKA, e infine sull'espressione di ABCB1 sono da ascrivere in prevalenza all'azione del propranololo sui recettori adrenergici, e in minor misura all'effetto antitetico di propranololo e fluoxetina sui recettori 5HT₁. Questa ipotesi è supportata dal risultato dell'analisi delle componenti principali condotta sui parametri biologici analizzati nella ghiandola digestiva, che mostra come il gruppo FX+PROP sia ben separato dal gruppo di campioni esposti a FX, ma presenta un alto grado di similitudine con il gruppo di campioni esposti a PROP.

Per comprendere se il propranololo interagisca con i recettori 5HT₁ abbiamo trattato *in vitro* emociti di mitilo con la serotonina, l'agonista fisiologico del recettore, usata da sola ed in presenza del propranololo. Rispetto agli emociti di controllo, la serotonina provoca una significativa diminuzione dei livelli di AMPc, dell'attività della PKA e dell'espressione del gene ABCB1, mentre nei campioni co-esposti alla serotonina (5HT+PROP) non si osservano variazioni significative rispetto al controllo. Questi dati dimostrano quindi che i) negli emociti di mitilo sono espressi recettori 5HT₁ accoppiati a proteine G inibitrici (da cui la riduzione dei livelli di AMPc), ii) il propranololo blocca l'effetto della serotonina, agendo come antagonista dei recettori 5HT₁ (infatti scompare l'effetto sui livelli di AMPc).

Per comprendere se l'AMPc sia direttamente responsabile della modulazione dell'espressione del gene ABCB1 attraverso l'azione della PKA, abbiamo esposto gli emociti di mitilo al dibutirilAMPc (dBAMPc), un analogo dell'AMPc attivatore specifico della PKA, e ad H89, un inibitore specifico della PKA. Risulta che il dBAMPc provoca l'aumento significativo dell'attività della PKA, come atteso, ma anche dell'espressione del gene ABCB1; inoltre, la co-esposizione con H89 è in grado di annullare completamente l'effetto di dBAMPc sia sull'attività della PKA che sull'espressione di ABCB1. Grazie a questi risultati si può affermare che l'espressione del gene ABCB1 nel mitilo è direttamente controllata dal sistema AMPc/PKA.

In conclusione, concentrazioni di propranololo e fluoxetina nell'intervallo di quelle misurate in ambiente possono generare significativi effetti sui vari parametri testati. Questi risultati, ottenuti a concentrazioni circa 1000 volte inferiori rispetto a quelle efficaci nei test ecotossicologici acuti, dimostrando che i farmaci possono avere effetti sull'ecosistema anche a concentrazioni molto basse come quelle ambientali. Questo è in linea con il fatto che i composti che utilizzano meccanismi d'azione specifici hanno maggiore probabilità di agire a bassa concentrazione. I dati della tesi non dimostrano che propranololo e fluoxetina hanno effetti deleteri sulle popolazioni o le comunità dei molluschi, ma debbono essere considerati come indicatori della vulnerabilità degli animali a questi composti. Tuttavia l'alterazione dei livelli di AMPc interferisce con processi alimentari, respiratori, riproduttivi dei molluschi (*Fabbri e Capuzzo, 2010*) ed anche sulle capacità di detossificazione (questo lavoro). Dal punto di vista ambientale questo approccio, attraverso lo studio del meccanismo d'azione, porta a classificare sia il propranololo che la fluoxetina come farmaci che meritano attenzione nella definizione di linee guida e nella progressiva sostituzione con farmaci più ecocompatibili. Dal punto di vista delle nuove conoscenze sulla fisiologia del mitilo, abbiamo dimostrato per la prima volta che gli emociti di mitilo possiedono recettori di tipo 5HT₁ correlati alla riduzione dei livelli intracellulari di AMPc, e soprattutto che il sistema AMPc/PKA è deputato

alla regolazione dell'espressione dei geni ABCB1 codificanti per proteine del complesso Multi Xenobiotic Resistance.

6. BIBLIOGRAFIA

- ❖ Ambudkar, S.V., Dey, S., Hrycyna, C.A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M.M., 1999. *Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter*. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, p. 361-398.
- ❖ Ashton, D., Hilton, M., Thomas, K.V., 2004. *Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom*. *Sci. Total Environ.* 333, p.167-184.
- ❖ Bard, S.M., 2000. *Multixenobiotic resistance as a cellular defence mechanism in aquatic organisms*. *Aquat. Toxicol.*48(4), p.357-389.
- ❖ Bardales, J.R., Cascallana, J.L., Villamirín, A., 2010. *Differential distribution of cAMP-dependent protein kinase isoforms in various tissues of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis**. *Acta Histochemica* 40, p. 251-259.
- ❖ Bardales, J.R., Dí'az-Enrich, M.J., Ibarguren, I., Villamarín, J.A., 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, p,71-78.
- ❖ Bardales, J.R., Hellman, U., Villamarín, J. A., 2007. *CK2-mediated phosphorylation of type II regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from the mollusc *Mytilus galloprovincialis**. *Arch Biochem Biophys*;461, p.130-137.
- ❖ Bardales, R., Dí'az-Enrich, M.J., Villamarín, A., 2009. *Differential distribution of cAMP-dependent protein kinase isoforms in the mantle of the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis**. *J Mol Histol* 40, p. 251-259.
- ❖ Barmo, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Olivieri, S., Bianchi, N., Gallo, G., Canesi, L., 2011. *Pleiotropic effects of hexavalent chromium (CrVI) in *Mytilus galloprovincialis* digestive gland*. *Chemosphere* 83, p.1087-1095.
- ❖ Brooker, R.J., Widmaier, E.P., Graham, L.E., Stiling P.D., 2008. *Biologia generale*. McGraw-Hill, p.181-184
- ❖ Brooks, B. W., Chambliss, C. K., Stanley, J. K., Ramirez, A., Banks, K. E., Johnson, R. D., Lewis, R. J. 2005. *Determination of select antidepressants in fish from an effluentdominated stream*. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, p. 464-469.
- ❖ Brooks, B.W., Foran, C.M., Richards, S.M., Weston, J., Turner, P.K., Stanley, J.K., Solomon, K.R., Slattery, M., La Point, T.W., 2003. *Aquatic ecotoxicology of fluoxetine*. *Toxicol. Lett.* 142 (3), p.169-183
- ❖ Cao, J., Ramos-Martínez, J.I., Villamarín, J.A., 1995. *Characterization of a cAMP-binding protein from the bivalve mollusc *Mytilus galloprovincialis**. *Eur J Biochem* 232, p.664-670.

- ❖ Chen, C. J., Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M., Roninson, I.B., 1986. *Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdrl (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells*. Cell 47, p. 381-389.
- ❖ Chin, H.V., Tanaka, S., Darlington, G.B., Pastan, I., Gottesman, M.M., 1990. *Heat shock and arsenite increase expression of the multidrug resistance (MDR1) gene in human renal carcinoma cells*. J. Biol. Chem. 265, p. 221-226.
- ❖ Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem 162 (1), p 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, p.167-181.
- ❖ Civantos Calzada, B., Aleixandre De Artinano, A., 2001. *Alpha-adrenoceptor subtypes* Pharmacol. Res. 44, p.195-208.
- ❖ 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(3-4), p.428-437.
- ❖ Cooper, J.M., Leise, E.M., 1996. *Serotonin injections induce metamorphosis in the larvae of the gastropod mollusk Illyanassa obsoleta*. Biol Bull 191, p.178-186.
- ❖ Cubero-Leon, E., Ciocan, C.M., Hill, E.M., Osada, M., Kishida, M., Itoh, N., Kondo, R., Minier, C., Rotchell, J.M., 2010. *Estrogens disrupt serotonin receptor and cyclooxygenase mRNA expression in the gonads of mussels (Mytilus edulis)*. Aquat. Toxicol. 98, p.178-187.
- ❖ Dailianis, S., Domouchtsidou, G.P., Raftopoulou, E., Kaloyianni, M., Dimitriadis, V.K., 2003. *Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of (Mytilus galloprovincialis) (L.) on pollution monitoring*. Mar Environ Res 56, p.443-470.
- ❖ Dailianis, S., Piperakis, S. M., Kaloyianni, M., 2005. *Cadmium effects on ROS production and DNA damage via adrenergic receptors stimulation: role of Na1/H1 exchanger and PKC*. Free Radic Res 39, p.1059-1070.
- ❖ Díaz-Enrich, M. J., Ibarguren, I., Hellman, U., Villamarín, J.A., 2003. *Characterization of a type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from the bivalve mollusk Mytilus galloprovincialis*. Arch Biochem Biophys 416, p.119-127.
- ❖ 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(2), p. 259-270.

- ❖ Ericson, H., Thorsén, G., Kumblad, L., 2010. *Physiological effects of diclofenac, ibuprofen and propranolol on Baltic Sea blue mussels*. *Aquat. Toxicol.* 99, p.223-231.
- ❖ Eytan, G., Kuchel, P.W., 1999. *Mechanism of action of P-glycoprotein in relation to passive membrane permeation*. *Int. Rev. Cytol.* 190, p. 175-250.
- ❖ Fabbri, E., Moon, T.W., 1994. *Adrenergic receptors and second messengers systems in liver of vertebrates*. In "Perspectives in Comparative Endocrinology". Natl. Res. Council Canada. p. 499-506.
- ❖ Fabbri, E., Capuzzo, A., 2006. *Adenylyl cyclase activity and its modulation in the gills of *Mytilus galloprovincialis* exposed to Cr(6+) and Cu(2+)*. *Aquat Toxicol* 76, p.59-68.
- ❖ Fabbri, E., Capuzzo, A., 2010. *Cyclic AMP Signaling in Bivalve Molluscs: An Overview*. *Exp. Zool.* 313A, p.179-200.
- ❖ Fent, K., 2003. *Ecotoxicological problems associated with contaminated sites*. *Toxicol let* 140-141, p. 356-365.
- ❖ Fent, K., Weston, A.A., Caminada, D., 2006. *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*. *Aquatic Toxicology* 76, p. 122-159.
- ❖ Fong, P.P., 1998. *Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)*. *Biol Bull* 194, p.143-149.
- ❖ Fong, P.P., Huminski, P.T., D'Urso, L.M., 1998. *Induction and potentiation of parturition in fingernail clams (*Sphaerium striatinum*) by selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)*. *J Exp Zool* 280, p 260-264.
- ❖ 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, p.299-308.
- ❖ Franzellitti, S., Fabbri, E., 2006. *Cytoprotective responses in the Mediterranean mussel exposed to Hg^{2+} and CH_3Hg^+* . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, p. 719-725.
- ❖ Gagnè, F., Blaise, C., Andrè, C., Gagnon, C., Salazar, M., 2007. *Neuroendocrine disruption and health effects in *Elliptio complanata* mussels exposed to aeration lagoons for wastewater treatment*. *Chemosphere* 68, p. 731-743.
- ❖ 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, p.278-284.
- ❖ Garrison, A.W., Pope, J.D., Allen, F.R., 1976. *Analysis of organic compounds in domestic wastewater*. In: Keith, C.H. (Ed.), *Identification and Analysis of Organic Pollutants in Water*. Ann Arbor Science, Michigan, USA, p. 517-566.

- ❖ Gibson, U. E., Heid, C. A., Williams, P. M., 1996. *A novel method for real time quantitative RT-PCR*. Genome Res. 6, p. 995-1001.
- ❖ Giltrow, E., Eccles, P.D., Winter, M.J., McCormack, P.J., Rand-Weaver, M., Hutchinson, T.H., Sumpter J.P., 2009 *Chronic effects assessment and plasma concentrations of the b-blocker propranolol in fathead minnows (Pimephales promelas)*, Aquat. Toxicol. 95, p. 195-202.
- ❖ Guerrero-Preston, R., Brandt-Rauf, P., 2008. *Pharmaceutical residues in the drinking water supply: modeling residue concentrations in surface waters of drugs prescribed in the United States*. P.R Health Sci J. 27(3), p. 236-240.
- ❖ Hannon, J., Hoyer, D., 2008. *Molecular biology of 5-HT receptors*. Behavioural Brain Research 195, p. 198-213
- ❖ Hanumante, M.M., Fingerman, M., 1983. *Effects of monoamines and monoaminergic agents on migration of the red pigment in chromatophores of the shrimp, Macrobrachium ohione*. Comp Biochem Physiol 74(C):303–309.
- ❖ Hennessy, M., Spiers, J.P., 2007. *A primer on the mechanics of the P-glycoprotein the multidrug transporter*. Pharmacol. Res.55, p.1-15.
- ❖ Hiemke, C., Hartter, S., 2000. *Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors*. Pharmacol. Ther. 85, p. 11-28.
- ❖ Higgins, C.F., Gottesman, M.M., 1992. *Is the multidrug transporter a flippase?* Trends Biochem. Sci. 17, p. 18-21.
- ❖ Honkoop, P., Luttikhuisen, P.C., 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, p. 297-300.
- ❖ Hoyer, D., Hannon, J. P., Martin, G.R., 2002. *Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors*. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 71, p 533-555.
- ❖ Huggett, D.B., Khan, I.A., Foran, C.M., Schlenk, D., 2003b. *Determination of betaadrenergic receptor blocking pharmaceuticals in United States wastewater effluent*. Environ. Pollut. 121, p. 199-205.
- ❖ Huschek, G., Hansen, P.D., Maurer, H.H., Kregel, D., Kayser, A., 2004. *Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to European Commission recommendations*. Environ. Toxicol. 19(3), p.226-240
- ❖ Ivanina, A. V., Sokolova, I. M., 2008. *Effects of cadmium exposure on expression and activity of P-glycoprotein in eastern oysters, Crassostrea virginica Gmelin*. Aquatic Toxicology 88, p. 19-28.

- ❖ Jacob, S., Rett, K., Henriksen, E.J., 1998. *Antihypertensive therapy and insulin sensitivity: do we have to redefine the role of beta-blocking agents?* Am. J. Hypertens. 11 (10), p. 1258-1265.
- ❖ Jones, O.A., Voulvoulis, N., Lester, J.N., 2002. *Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals.* Water Res 36(20), p. 5013-5022.
- ❖ Keppler, C.J., Ringwood, A.H., 2001. *Expression of P-glycoprotein in southeastern oysters, Crassostrea virginica.* Mar. Environ. Res. 52, p. 81-96.
- ❖ Khan, S.J., Ongerth, J.E., 2004. *Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations.* Chemosphere 54(3), p. 355-367
- ❖ Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. *Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams.* Environ. Sci. Technol.36, p. 1202-1211
- ❖ Koutsogiannaki, S., Evangelinos, N., Koliakos, G., Kaloyianni, M., 2006. *Cytotoxic mechanisms of Zn21 and Cd21 involve Na/H exchanger (NHE) activation by ROS.* Aquat Toxicol 78, p. 315-324.
- ❖ Kulkarni, G.K., Fingerman, M., 1992. *Effects of 5-hydroxytryptamine agonists on ovarian development in the fiddler crab, Uca pugilator.* Comp Biochem Physiol 101(C), p. 419-423.
- ❖ Kulkarni, G.K., Nagabhushanam, R., Amaldoss, G., Jaiswal, R.G., Fingerman, M., 1992. *In vivo stimulation of ovarian development in the red swamp crayfish, Procambarus clarkii (Girard), by 5-hydroxytryptamine.* Invert Rep Dev 21, p. 231-240.
- ❖ Kurelac, B., 1992. *The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms.* Critic. Rev. Toxicol. 22, p. 23-43
- ❖ Kwon, J. W., Armbrust, K. L. 2006. *Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments.* Environ. Toxicol.Chem. 25, p. 2561-2568.
- ❖ Lacoste, A., Malham, S. K., Cueff, A., Poulet, S. A., 2001c. *Noradrenaline modulates oyster hemocyte phagocytosis via a b-adrenergic receptor-cAMP signaling pathway.* Gen Comp Endocrinol 122, p. 252-259.
- ❖ Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J., and Van Der Kraak, G. 2009. *Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation.* Aquat. Toxicol. 95, p. 320-329.
- ❖ Livak, K. J., Schmittgen, T. D., 2001. *Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.* Methods 25, p. 402-408.
- ❖ Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr. A.L., Randall, R.J., 1951. *Protein measurement with the Folin Phenol Reagent.* J. Biol Chem 193, p. 265-275.

- ❖ Lubet, P., 1957. *Cycle sexuel de Mytilus edulis L. et de Mytilus galloprovincialis Lmk.* Annèe Biol. 33, p. 19-29.
- ❖ Marazziti, D., Golini, E., Gallo, A., Lombardi, M.S., Matteoni, R., Tocchini-Valentini, G.P., 1997. *Cloning of GPR37, a gene located on chromosome 7 encoding a putative G-protein-coupled peptide receptor, from a human frontal brain EST library.* Genomics 45, p. 68-77.
- ❖ 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.* Aquatic Toxicology 94, p. 177-185
- ❖ Mennigen, J. A., Crump, K., Xiong, H., Zhao, E., Popesku, P., Anisman, H., Xia, X., Trudeau, V. L. 2008. *The effects of fluoxetine on the reproductive axis of female goldfish (Carassius auratus).* Physiol. Genom. 35, p. 273-282.
- ❖ Mennigen, J. A., Harris, E. A., Chang, J. P., Moon, T. W., and Trudeau, V. L. 2009. *Fluoxetine affects weight gain and expression of feeding peptides in the female goldfish brain.* Regul. Peptides 155, p. 99-104.
- ❖ Mennigen, J. A., Sassine, J., Trudeau, V. L., Moon, T. W. 2010. *Effects of waterborne fluoxetine on food intake and parameters of energy metabolism in the goldfish, Carassius auratus.* Aquat. Toxicol. doi:10.1016/j.aquatox.2010.07.022.
- ❖ Metcalfe, C. D., Chu, S., Judt, C., Li, H., Oakes, K. D., Servos, M. R., Andrews, D. M. 2010. *Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed.* Environ. Sci. Chem. 29, p. 79-89.
- ❖ Millar, R.P., Newton, C.L., 2010. *The year in G protein-coupled receptor research.* Mol. Endocrinol. 24, p. 261-274.
- ❖ Minh, T.B., Leung, H.W., Loi, I.H., Chan, W.H., So, M.K., Mao, J.Q., Choi, D., Lam, J.C., Zheng, G., Martin, M., Lee, J.H., Lam, P.K., Richardson, B.J., 2009. *Antibiotics in the Hong Kong metropolitan area: ubiquitous distribution and fate in Victoria Harbour.* Mar. Pollut. Bull. 58, 1052-1062.
- ❖ Minier, C., Borghi, V., Moore, M.N., Porte, C., 2000. *Seasonal variation of MXR and stress proteins in the common mussel, Mytilus galloprovincialis.* Aquat. Toxicol. 50, p. 167-176.
- ❖ Mitchell, L. G., Mutchmor, J. A., Dolphin, W. D., 1988. *Zoologia.* Zanichelli, p. 574-600.
- ❖ Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D., 2007. *Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments.* Anal Bioanal Chem 387, p. 1225-1234.

- ❖ Paterson, G., and Metcalfe, C.D. 2008. *Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (Oryzias latipes)*. Chemosphere 74, p. 125-130.
- ❖ Quian, X.D., Beck, W.T., 1990. *Progesterone photoaffinity labels p-glycoprotein in multidrug-resistant human leukemic lymphoblasts*. J. Biol. Chem. 265, p. 18753-18756.
- ❖ Raftopoulou, E., Dailianis, S., Dimitriadis, V.K., Kaloyianni, M., 2006. *Introduction of cAMP and establishment of neutral lipids alterations as pollutant biomarkers using the mussel Mytilus galloprovincialis*. Correlation with a battery of biomarkers. Sci Tot Environ 368(2-3), p.597-614.
- ❖ Richardson, M.L., Bowron, J.M., 1985. *The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment*. J. Pharm. Pharmacol. 37(1), p. 1-12.
- ❖ Roberts, P., Thomas, K.V., 2006. *The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the Tyne Estuary. UK and its tributaries*. Sci. Total Environ. 356, p.143-153.
- ❖ Rodríguez, J.L., Barcia, R., Ramos-Martínez, J.I., Villamarín, J.A., 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, p. 57-62.
- ❖ Rogers, I.H., Birtwell, I.K., Kruzynski, G.M., 1986. *Organic extractables in municipal wastewater of Vancouver, British Columbia*. Water Pollut. Res. J. Can. 21, p. 187-204.
- ❖ Rohlf, C., Glazer, R.I., 1995. *Regulation of multidrug resistance through the cAMP and EGF signalling pathways*. Cell Signal. 7, p. 431-443.
- ❖ Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- ❖ Santos, L.H., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C., 2010. *Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*. J. Hazard. Mater. 175, p. 45-95.
- ❖ Semsar, K., Perreault, H. A., Godwin, J. 2004. *Fluoxetine-treated male wrasses exhibit low AVT expression*. Brain Res.1029, p.1141-147.
- ❖ Shpakov, A. O., Shipilov, V. N., Bondareva, V. M., 2005. *Sensitivity of adenylyl cyclase signalling system of the mollusk Anodonta cygnea ganglions to serotonin and adrenergic agonists*. Ann NY Acad Sci 1040, p.1466-468.
- ❖ Smital, T., Pivčević, B., Kurelac, B., 1996. *Reversal of multidrug resistance by extract from the marine alga Caulerpa taxifolia*. Period. Biol. 98, p. 165-171.
- ❖ Strosberg, A.D. 1995. *Structural and functional diversity of b-adrenergic receptors*. Ann. NY Acad. Sci. 757, p. 253-260.

- ❖ Sunahara, R.K., Taussig, R., 2002. *Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling*. Mol Interv 2, p. 168-184.
- ❖ 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, p. 175-185.
- ❖ Ternes, T.A., 1998. *Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers*. Water Res. 32, p. 3245-3260.
- ❖ Thomas, K.V., Hilton, M.J., 2004. *The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries*. Mar. Pollut. Bull. 49(5/6), p. 436-444.
- ❖ Thomas, K.V., Langford, K.H., 2007. *Occurrence of pharmaceuticals in the aqueous environment*. In: Barcelò, M., Petrovic, D. (Eds.), Analysis, Fate and Removal of Pharmaceuticals in the Water Cycle, Amsterdam, p. 341-363.
- ❖ Tierney, A. J., 2001. *Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A (128), p. 791-804.
- ❖ Toomey, B.H., Kaufman, M.R., Epel, D., 1996. *Marine bacteria produce compounds that modulate multixenobiotic transport activity in Urechis caupo embryos*. Mar. Environ. Res. 42, p. 393-397.
- ❖ Uhler, G.C., Huminski, P.T., Les, F.T., Fong, P.P., 2000. *Cilia-driven rotational behavior in gastropod (Physa elliptica) embryos induced by serotonin and putative selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs)*. J Exp Zool 286, p. 414-421.
- ❖ Van Harten, J., 1993 *Clinical pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors*. Clin. Pharmacokinet. 24, p. 203-220.
- ❖ Viarengo, A., Canesi, L., 1991. *Mussels as biological indicators of pollution*. Aquaculture. 94, p. 225-243.