

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

Scuola di Scienze

Corso di Laurea Magistrale in Analisi e Gestione dell'Ambiente

**Contaminanti emergenti nei suoli: il lombrico
Eisenia andrei come modello sperimentale per la
valutazione degli effetti biologici del bisfenolo A**

Tesi di Laurea in Fisiologia applicata all'Ambiente

Relatore:

Prof.ssa Elena Fabbri

Presentata da:

Sara Arniani

Correlatori:

Prof. Andrea Pasteris

Dott.ssa Sara Buratti

III Sessione Anno Accademico 2011-2012

Sommario

1. Introduzione.....	1
1.1 Contaminanti emergenti: gli interferenti endocrini.....	1
1.2 Regolamentazione degli interferenti endocrini.....	3
1.3 Bisfenolo-A: nascita e sviluppo.....	5
1.4 Caratteristiche chimico-fisiche del BPA.....	6
1.5 Destino in ambiente e vie di esposizione.....	7
1.6 Esposizione umana al BPA.....	8
1.7 Possibili effetti sulla salute umana.....	9
1.8 Meccanismo di azione del BPA come interferente endocrino.....	13
1.9 Regolamentazione della sostanza.....	15
1.10 E' possibile ridurre l'esposizione al BPA?.....	16
1.11 Il Bisfenolo A nella matrice suolo.....	17
1.12 La tutela del suolo.....	18
1.13 Il biomonitoraggio del suolo.....	20
1.14 I Bioindicatori.....	22
1.15 I lombrichi come bioindicatori negli ecosistemi terrestri.....	23
1.16 Ecologia dei lombrichi.....	25
1.17 Ecologia di <i>Eisenia andrei</i>	26
1.18 I biomarker.....	27
1.19 Batteria di biomarker utilizzati per il lombrico <i>Eisenia andrei</i>	29
1.20 Stabilità delle membrane lisosomiali.....	30
1.21 Biomarker istochimici.....	31

1.21.1	Accumulo di lipofuscine nei lisosomi.....	31
1.21.2	Accumulo di lipidi neutri insaturi nei lisosomi.....	32
1.22	Biomarker enzimatici.....	33
1.22.1	Attività dell'enzima Acetilcolinesterasi (AChE).....	33
1.22.2	Lo stress ossidativo.....	34
1.22.3	Catalasi (CAT).....	35
1.22.4	Glutathione-S-Transferasi (GST).....	36
1.22.5	Malondialdeide (MDA).....	37
2.	Scopo della tesi.....	38
3.	Materiali e Metodi.....	40
3.1	Principio dell'esperimento.....	40
3.2	Allevamento di partenza.....	40
3.3	Test di esposizione.....	43
3.4	Batteria di biomarker	47
3.5	Neutral Red Retention Assay (NRRA).....	48
3.5.1	Estrazione dei celomociti.....	49
3.5.2	Preparazione e lettura dei vetrini.....	49
3.5.3	Analisi di immagine.....	50
3.6	Biomarker istochimici.....	51
3.6.1	Preparazione dei chunks.....	51
3.6.2	Accumulo di lipofuscine nei lisosomi.....	51
3.6.2.1	Analisi di immagine.....	52
3.6.3	Accumulo di lipidi neutri insaturi nei lisosomi.....	52
3.6.3.1	Analisi di immagine.....	53

3.7 Biomarker enzimatici.....	54
3.7.1 Preparazione degli omogenati.....	54
3.7.2 Dosaggio delle proteine.....	55
3.7.3 Attività dell'enzima Acetilcolinesterasi (AChE).....	56
3.7.4 Attività dell'enzima Catalasi (CAT).....	58
3.7.5 Attività dell'enzima Glutatione-S-Transferasi (GST).....	59
3.7.6 Malondialdeide (MDA).....	60
3.8 Analisi statistica dati.....	61
4. Risultati e Discussione.....	62
4.1 Parametri del ciclo vitale.....	62
4.1.1 Mortalità.....	62
4.1.2 Accrescimento.....	63
4.1.3 Riproduzione.....	67
4.2 Biomarker.....	71
4.2.1 Stabilità delle membrane lisosomiali.....	71
4.2.2 Accumulo lisosomiale di lipofuscine.....	72
4.2.3 Accumulo lisosomiale di lipidi neutri.....	74
4.2.4 Attività dell'enzima Acetilcolinesterasi.....	76
4.2.5 Attività dell'enzima Catalasi.....	78
4.2.6 Attività dell'enzima Glutatione-S-Tranferasi.....	79
4.2.7 Malondialdeide.....	80
5. Conclusioni.....	81
6. Bibliografia.....	83

1. Introduzione

1.1 Contaminanti emergenti: gli interferenti endocrini

Gli interferenti endocrini (IE) sono sostanze in grado di alterare il sistema endocrino, influenzando negativamente diverse funzioni vitali quali lo sviluppo, la crescita, la riproduzione e il comportamento sia nell'uomo che nelle specie animali.

La “Strategia Comunitaria in materia di sostanze che alterano il sistema immunitario” (COM_1999_706) ha adottato la definizione di interferente endocrino come una *“sostanza esogena che altera la funzionalità del sistema endocrino, causando effetti avversi sulla salute di un organismo, oppure della sua progenie o di una (sotto)popolazione”*.

Nel 2009, nel corso di un seminario organizzato dall'Istituto federale tedesco per la valutazione dei rischi (BfR) a Berlino, è stato specificato cosa si intende per effetto avverso:

“Un cambiamento di morfologia, fisiologia, la crescita, la riproduzione, lo sviluppo o la durata della vita di un organismo che si traduce in compromissione della capacità funzionale o compromissione della capacità di compensare lo stress aggiuntivo o maggiore suscettibilità agli effetti nocivi di altri fattori ambientali”.

Un'altra definizione valida di interferente endocrino è stata fornita dal governo Canadese:

“(...) Una sostanza avente la capacità di interrompere sintesi, secrezione, trasporto, legame, azione o eliminazione di ormoni naturali in un organismo, o la sua progenie, che sono responsabili per il mantenimento dell'omeostasi, la riproduzione, lo sviluppo o il comportamento dell'organismo” (Canadian Environment Protection Act, 1999).

Gli interferenti endocrini possono agire a diversi livelli:

- ⤴ possono mimare l'attività biologica di un ormone legandosi al suo recettore cellulare, avviando una normale risposta per l'ormone naturale ma al momento sbagliato o in misura eccessiva (effetto agonista);
- ⤴ possono legarsi al recettore ma non attivarlo: la presenza della sostanza chimica sul recettore impedirà il legame dell'ormone naturale (effetto antagonista);
- ⤴ possono legarsi alle proteine di trasporto nel sangue, alterando così la quantità di

ormoni naturali che sono presenti in circolo;

- ♣ possono interferire con i processi metabolici del corpo, alterando la sintesi o i tassi di degradazione degli ormoni naturali.

Le sostanze che possono alterare il sistema endocrino sono state raggruppate in tre principali categorie:

- ♣ gli ormoni naturali (estrogeni, progesterone, testosterone naturalmente prodotti nell'organismo umano o animale) e i fitoestrogeni contenuti in alcune piante (come i germogli alfalfa e i semi di soia);
- ♣ gli ormoni di sintesi (concepiti espressamente per interferire sul sistema endocrino modulandone la funzionalità);
- ♣ le sostanze chimiche sintetizzate dall'uomo, concepite per usi industriali, agricoli (ad es. prodotti fitosanitari) e per taluni beni di consumo (ad es. additivi per materiale plastico) nonché sostanze chimiche (contaminanti) derivanti dai processi industriali (ad es. diossine).

Nell'ambiente è stato osservato che gli interferenti endocrini possono causare anomalie nella riproduzione di alcune specie, associate a cambiamenti nel comportamento e alterazioni del sistema immunitario. In particolare sono stati osservati fenomeni di mascolinizzazione o femminilizzazione in molluschi e pesci di aree contaminate. Nell'uomo gli interferenti endocrini possono giocare un ruolo rilevante nella compromissione della capacità riproduttiva e in alcune patologie quali malformazioni congenite dei neonati, sviluppo di tumori endocrini (tiroide, ovaio), ritardo nello sviluppo sessuale, ritardo nello sviluppo neurocomportamentale, e alterazione del sistema immunitario.

1.2 Regolamentazione degli interferenti endocrini

L'interesse della comunità scientifica e amministrativa nei confronti dei possibili effetti sulla salute umana e sull'ambiente dovuti all'esposizione ad interferenti endocrini è sensibilmente aumentato in questo ultimo decennio, acquisita la consapevolezza che queste sostanze possono agire in fasi particolari del ciclo vitale (in particolare nel periodo embrionale e fetale), colpendo le fasce maggiormente vulnerabili della popolazione.

A livello internazionale, l'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OCSE) ha pubblicato una serie di linee guida per identificare i potenziali interferenti endocrini. A questo programma stanno partecipando attivamente l'ECHA (Agenzia Europea per le sostanze chimiche), l'EFSA (Autorità Europea sulla sicurezza alimentare) e alcuni Stati membri.

La Strategia Comunitaria (COM_1999_706) ha permesso di individuare un primo gruppo di sostanze (alcune centinaia) che agiscono come interferenti endocrini e ha reso possibile l'adozione di alcuni interventi di carattere normativo con i quali sono state stabilite procedure per una gestione mirata del rischio di queste sostanze, primo fra tutti il regolamento "REACH" (acronimo di Registration, Evaluation, Authorisation of CHemicals) formalmente adottato il 18 dicembre 2006, ed entrato in vigore il 1° giugno 2007, che tratta gli interferenti endocrini nel Titolo VII riguardante l'autorizzazione delle sostanze "estremamente preoccupanti".

Per sostanze "estremamente preoccupanti" si intendono, ai sensi dell'art. 57 del regolamento, le sostanze classificate come cancerogene, mutagene e tossiche per la riproduzione (CMR), le sostanze identificate come persistenti, bioaccumulabili e tossiche (PBT), quelle identificate come molto persistenti e molto bioaccumulabili (vPvB) ed infine le sostanze "aventi proprietà che perturbano il sistema endocrino, per le quali è scientificamente comprovata la probabilità di effetti gravi per la salute umana o per l'ambiente e che danno adito ad un livello di preoccupazione equivalente a quello delle altre sostanze". Le sostanze appartenenti ai gruppi CMR, PBT, vPvB, possono essere prodotte e utilizzate solo previa autorizzazione della Commissione Europea (a seguito di una istruttoria effettuata dall'Agenzia europea per le sostanze chimiche) concessa solo per usi specifici.

Un altro provvedimento legislativo che tratta gli interferenti endocrini è il Regolamento (CE) 1107/2009 del 21/10/2009 sui prodotti fitosanitari. Ai sensi di questo regolamento, le sostanze identificate come aventi proprietà IE e che possono causare effetti avversi negli esseri umani, non possono essere autorizzate.

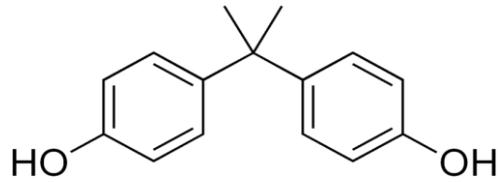
Nel 2009 la Commissione ha adottato il Regolamento (UE) 528/2012 sui Biocidi, successivamente approvato dal Parlamento Europeo e dal Consiglio nel 2012, che sostituisce la direttiva 98/8/CE e impone condizioni specifiche per l'autorizzazione di sostanze attive classificate come CMR o aventi proprietà di interferenti endocrini.

La Commissione ha pubblicato, nell'agosto del 2011, il 4° rapporto relativo all'attuazione della strategia comunitaria in materia di sostanze che alterano il sistema endocrino.

I prossimi obiettivi a breve termine, emersi dall'ultima conferenza sugli IE svoltasi a Bruxelles a giugno 2012 sono:

- entro la fine del 2013 proporre i criteri scientifici specifici da adottare per l'identificazione delle sostanze con proprietà di interferente endocrino ai sensi dei regolamenti sui prodotti fitosanitari e sui biocidi; in attesa di tali criteri, il Regolamento prevede che le sostanze classificate come cancerogene (cat.2) e tossiche per la riproduzione (cat.2) siano comunque da non autorizzare per l'impiego;
- nel giugno 2013 verrà riesaminata l'autorizzazione, ai sensi del regolamento REACH, delle sostanze ritenute interferenti sul sistema endocrino;
- parallelamente verrà rivista la Strategia comunitaria del 1999 alla luce delle prove scientifiche attualmente disponibili.

1.3 Bisfenolo-A: nascita e sviluppo



Una delle sostanze che agisce come interferente endocrino è il 2,2-bis (4-idrossifenil) propano (CAS 80-05-7) conosciuto come bisfenolo A, abbreviato in BPA, un composto organico con due gruppi fenolo.

Il BPA è stato sintetizzato per la prima volta nel 1891 e a partire dal 1930 è stato testato per un potenziale uso farmaceutico come estrogeno sintetico (Vogel, 2009). Sebbene abbia mostrato di possedere una certa attività estrogenica, non è stato utilizzato a scopi farmaceutici in quanto il dietilstilbestrolo (DES), un composto sintetico strutturalmente simile al BPA, mostrava un'attività estrogenica molto più elevata. Dal 1940 il DES è stato somministrato per prevenire nascite precoci e aborti spontanei (Rubin, 2007), per essere poi ritirato nel 1971 perché responsabile dell'induzione di tumori vaginali nelle figlie delle donne trattate. A partire dagli anni 50 è iniziato un utilizzo massivo del BPA da parte delle industrie produttrici di plastiche. Infatti Il BPA è un monomero chiave nella produzione delle resine epossidiche e nelle più comuni forme di policarbonato.

Il policarbonato, che è pressoché infrangibile, è usato per un gran numero di prodotti per bambini (es. biberon), stoviglie, contenitori di plastica per microonde, bottiglie per bibite, attrezzature sportive, lenti per gli occhiali, elettrodomestici, caschi di protezione, otturazioni dentarie ed ovunque siano necessarie caratteristiche di durezza e resistenza.

Le resine epossidiche che contengono BPA sono invece utilizzate come rivestimento interno nella maggior parte delle lattine e scatolette per alimenti e bevande o come rivestimento per i coperchi in metallo di barattoli e bottiglie di vetro (ad esempio per gli omogeneizzati e i succhi di frutta) (fonte arpa_emilia-romagna).

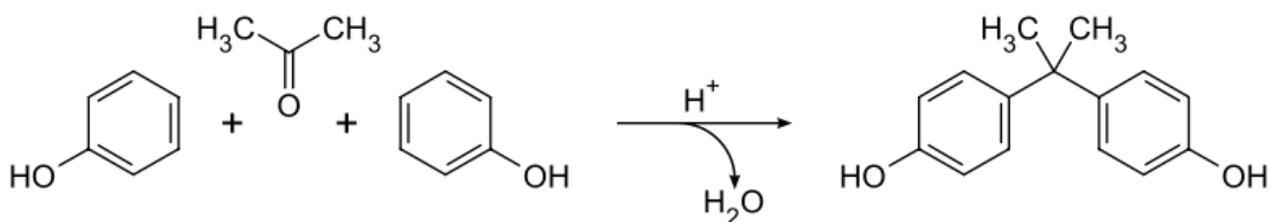
Il BPA è inoltre impiegato in una varietà di altre applicazioni: vernici a base di resine epossidiche, stucco per legno, ritardanti di fiamma, adesivi, materiali da costruzione, componenti elettronici, rivestimenti di carta (Staples et al., 1998), fabbricazione di pneumatici e fluido dei freni, resine e sigillanti dentali (Fleisch et al., 2010), rivestimenti di cd e dvd e inchiostri per stampanti. È inoltre presente in almeno 15 tipologie di prodotti cartacei, tra cui volantini, riviste e giornali, tovaglioli e fazzoletti di carta, carta igienica,

banconote, biglietti da visita, buste postali, carte d'imbarco aereo e carta termica, impiegata, ad esempio, nei registratori di cassa, nelle etichette per bagagli, nei biglietti del bus, del treno e della lotteria.

Il bisfenolo A è diventato persistente nell'ambiente negli ultimi 80 anni a causa della sua continua presenza e diffusione. Poiché la domanda dei prodotti contenenti BPA è aumentata, così ha fatto la produzione. Nel 2003 a livello mondiale la produzione di BPA era di 3,2 milioni di tonnellate (Tsai, 2006), circa un terzo dei quali è stato prodotto negli Stati Uniti. Il consumo globale di BPA nell'anno 2011 è stato superiore a 5,5 milioni di tonnellate, mentre oltre 100 tonnellate vengono rilasciate ogni anno nell'atmosfera (Vandenberg et al., 2009).

1.4 Caratteristiche chimico-fisiche del BPA

Una prima indicazione della potenziale distribuzione di BPA in ambiente può essere ottenuta dalle sue proprietà fisico-chimiche. Il BPA viene preparato tramite la condensazione dell'acetone (da cui il suffisso A nel nome) con due equivalenti di fenolo. La reazione è catalizzata da un acido, come l'acido cloridrico (HCl) o da una resina sulfonata di polistirene.



Il composto risultante a temperatura ambiente ha una pressione di vapore bassa, alto punto di fusione e solubilità moderata (Cousins et al., 2002; Howard, 1989; Shareef et al., 2006), ed è pertanto improbabile che il BPA rilasciato in ambiente acquatico si volatilizzi e si ri-depositi al suolo. Si ritiene che meno dell'1% del BPA in ambiente si volatilizzi nell'atmosfera, dove subisce una rapida degradazione per foto-ossidazione (Cousins et al., 2002; Howard, 1989). Il contenuto di BPA in atmosfera infatti è sensibilmente inferiore a quello rilevabile nell'acqua e nel suolo. Questo dipende dalla scarsa volatilità e

dalla breve emivita. Il potenziale di trasporto in aria è notevolmente inferiore (<0,0001%) a quelli misurabili in acqua (~30%) e nel suolo (~68%) (Staples et al., 1998). Il BPA presente nel particolato ambientale è degradato con ogni probabilità da radicali idrossilici e l'emivita di reazione è stimata in 4,8 ore. La fotodegradazione del BPA in aria, avviene con una emivita compresa tra 0,7 e 7,4 ore (Minoia et al., 2008).

Sulla base dei risultati di prove standard di biodegradazione raccomandate dall'OCSE, il BPA è classificato come facilmente biodegradabile (West et al., 2001).

In base ai valori di log Kow che vanno da 2,20 a 4,16 (Dorn et al., 1987; Shao et al., 2007; Staples et al., 1998; Tsai, 2006; Yoon et al., 2003), il BPA è da considerarsi a bassa (Heinonen et al., 2002) o moderata (Cousins et al., 2002) idrofobicità e quindi avrebbe una modesta capacità di bioaccumulo. Basandosi su queste caratteristiche, si stima che i maggiori comparti ambientali in cui si può trovare il BPA siano abiotici ed associati con acqua e solidi sospesi (53%), suolo (25%), o sedimenti (23%) (Cousins et al., 2002; Environment Canada, 2008; Staples et al., 1998).

1.5 Destino in ambiente e vie di esposizione

Il BPA si trova a bassi livelli in acque superficiali, sedimenti, suoli e biota. Anche se si degrada rapidamente, è persistente nell'ambiente a causa di continue immissioni (Oehlmann et al., 2009). Il BPA può essere rilasciato direttamente o indirettamente nell'ambiente a qualsiasi livello del ciclo di vita di un prodotto: produzione, consumo, smaltimento.

Nella fase produttiva si hanno emissioni accidentali durante il trattamento e la lavorazione dei monomeri plastici (NTP, 2008). I rilasci durante il consumo, per quanto riguarda gli alimenti, sono dovuti ad una piccola frazione di BPA che viene ingerito poiché migra nel tempo dal contenitore al contenuto (es. bevanda in lattina o contenitore per microonde). I principali fattori che influenzano il passaggio del BPA negli alimenti sono la durata e la temperatura di riscaldamento durante la fase di inscatolamento. Anche il contatto con composti acidi o basici, la presenza di elevati livelli di cloruro di sodio o di oli vegetali, è in grado di provocare un incremento del rilascio di BPA dai materiali polimerici (Minoia et al., 2008). Numerosi studi hanno evidenziato che il BPA viene rilasciato dai biberon in policarbonato (Vandenberg et al., 2007), che in molti Paesi sono stati ritirati dal

commercio nel 2011, e da bottiglie di acqua riutilizzabili (Le et al., 2008). Inoltre, altri studi hanno documentato la lisciviazione del BPA dalle resine usate per il rivestimento di barattoli e lattine contenenti alimenti per animali, verdure e pesce, e alimenti per lattanti in scatola (Vandenberg et al., 2007).

L'esposizione al BPA non avviene solo per via alimentare. Molti prodotti non alimentari possono rilasciare BPA per inalazione o per contatto: un esempio è quello della carta termica degli scontrini e delle fotocopie che rilascia BPA attraverso il contatto con l'epidermide (Braun et al., 2011). Studi recenti hanno confermato che il BPA viene assorbito facilmente attraverso questa via (Zalko et al., 2011).

I rilasci post-consumo sono principalmente dovuti agli scarichi di impianti di depurazione delle acque reflue municipali, alla lisciviazione dalle discariche, alla combustione di rifiuti domestici, e alla degradazione di materie plastiche (Crain et al., 2007; Kang et al., 2007; Kinney et al., 2006; Sidhu et al., 2005; US Environmental Protection Agency, 2010).

1.6 Esposizione umana al BPA

Il BPA è assunto dall'organismo umano soprattutto per via alimentare e per contatto, viene in genere rapidamente escreto attraverso le urine, ed è considerato privo di tossicità acuta. Negli adulti, il BPA è rapidamente e completamente assorbito nel tratto gastrointestinale. E' poi rapidamente metabolizzato nel fegato attraverso la glucuronidazione, ed eliminato con le urine (Volkel et al., 2002). L'escrezione urinaria è stata scelta come marker di esposizione umana al BPA.

Il BPA è stato misurato nelle urine umane di diverse popolazioni di tutto il mondo. Uno studio del 2008 condotto dal US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) su più di 2500 americani ha rilevato BPA nel 92,6% dei partecipanti (Calafat et al., 2008). Le concentrazioni nelle urine variavano da 0,4-149 mg / litro ed erano significativamente più alte nei bambini e negli adolescenti rispetto agli adulti. Il BPA è presente in concentrazioni misurabili anche nel siero, nel latte materno, nel plasma del feto, nel liquido amniotico e nella placenta (Minoia et al., 2008), e può essere accumulato anche nel tessuto adiposo umano (Fernandez et al., 2007).

Negli ultimi dieci anni, molteplici studi hanno rilevato le concentrazioni di BPA libero,

non coniugato, nel siero umano a livelli che vanno da 0,2-20 ng / ml di siero. I livelli relativamente elevati di BPA nel siero di donne in stato di gravidanza, nel sangue del cordone ombelicale, e nel plasma fetale (Vandenberg et al., 2007) indicano che il BPA attraversa la barriera placentare.

1.7 Possibili effetti sulla salute umana

Recentemente è stato condotto uno studio di grandi dimensioni sui possibili effetti sulla salute correlati all'esposizione di BPA negli esseri umani, rivelando correlazioni positive tra le concentrazioni urinarie di BPA e l'insorgenza di diabete, malattie cardiache, e tossicità epatica (Lang et al., 2008). Questo studio trasversale è stato condotto utilizzando i campioni e le informazioni raccolte dal CDC e dallo studio Nutrition Examination Survey (NHANES) svolto su 1.455 adulti americani. Tuttavia, saranno necessarie ulteriori ricerche per determinare se l'associazione tra le concentrazioni di BPA nelle urine e la prevalenza della malattia sia o meno causale.

Alcuni studi hanno valutato l'associazione tra esposizione a BPA e insorgenza nell'uomo di alterazioni a carico del processo riproduttivo e dello sviluppo. È stato dimostrato che livelli elevati di BPA in urina o in campioni ematici sono correlati con:

- aumento del testosterone in entrambi i sessi (Takeuchi 2002; Takeuchi 2004);
- diminuzione dell'ormone follicolo stimolante (FSH) in soggetti professionalmente esposti (Hanaoka 2002);
- sindrome dell'ovaio policistico (Takeuchi 2002; Takeuchi 2004);
- aborti ricorrenti (Sugiura-Ogasawara, 2006);
- anomalie cromosomiche in età fetale (Yamada, 2002).

A causa della sua ubiquità ambientale, gli organismi possono essere esposti al BPA cronicamente oppure durante le fasi di vita sensibili (Flint et al., 2012).

Gli studi condotti su animali hanno evidenziato che l'esposizione a dosi elevate di BPA (in particolare durante la gravidanza e l'allattamento) comporta effetti sullo sviluppo animale, tra cui una riduzione della sopravvivenza (per una concentrazione ≥ 500 mg/kg/giorno), una diminuzione della crescita (≥ 300 mg/kg/giorno) e un ritardo dell'inizio dell'età puberale (≥ 50 mg/kg/giorno). I livelli di BPA somministrati in questi esperimenti sono ingenti, soprattutto se confrontati con l'*intake* medio giornaliero stimato per il bambino ($< 14,7$ $\mu\text{g}/\text{kg}$), per l'adulto ($< 1,5$ $\mu\text{g}/\text{kg}$) e per il lavoratore esposto (< 100

µg/kg). Per simulare l'esposizione umana è stata diminuita sensibilmente la dose di BPA assunta dai roditori ($\geq 0,0024$ mg/kg/giorno): questa dose è stata associata ad alterazioni neurali e comportamentali, a lesioni precancerose della prostata e della ghiandola mammaria, a uno sviluppo anomalo del tratto urinario e della prostata e a pubertà precoce nei roditori di sesso femminile (Ye et al., 2007).

Il BPA è classificato con la sigla R62 (possibile rischio di ridotta fertilità) nel database ecotossicologico delle sostanze chimiche del Ministero dell'Ambiente.

Gli studi condotti all'interno del progetto italiano "PREVIENI" (condotto dal 2008 al 2010 dall'Istituto Superiore di Sanità) in alcune aree "pilota" hanno evidenziato che nelle donne infertili che abitano in grandi centri urbani si riscontrano livelli più alti di BPA.

Uno studio americano ha correlato, per la prima volta, l'esposizione al BPA con la qualità degli ovociti delle donne: i risultati indicano che se il livello della sostanza nel sangue raddoppia, la percentuale di ovociti fertilizzati in vitro si dimezza (Fujimoto et al, articolo in stampa).

Il BPA è entrato a far parte della famiglia di composti chiamati "obesogeni", poiché negli ultimi anni sono state riscontrate forti correlazioni tra la presenza di questa sostanza nell'organismo e l'incidenza di diabete e obesità. Alonso-Magdalena et al. (2006) hanno dimostrato che l'esposizione a basse dosi di BPA nei topi (10 µg/kg/giorno) è correlata all'insorgenza di un quadro di insulino-resistenza, aspetto caratteristico del diabete di tipo II. Studi più recenti (Wei et al., 2011) hanno confermato e ampliato i risultati precedenti con correlazioni positive tra l'esposizione fetale/neonatale al BPA e patologie metaboliche tra cui l'obesità, l'insulino-resistenza e l'intolleranza al glucosio.

Ulteriori conferme arrivano dagli studi basati su modelli animali svolti all'interno del progetto NAHNES (National Health and Nutrition Examination Survey) dal 2003 al 2008 che hanno mostrato come l'esposizione al BPA sia legata alla resistenza all'insulina (Vandenberg et al., 2009) e, quindi, ha un ruolo nell'aumento di peso e nello sviluppo di obesità (Shankar et al., 2012; Lang et al., 2008; Rubin et al., 2009). In uno studio sperimentale su espianti di tessuti umani, sono state trovate evidenze che implicano il BPA nello sviluppo della resistenza all'insulina e della sindrome metabolica (Hugo et al., 2008). Inoltre, il BPA è stato associato a noti fattori di rischio come l'ipertensione (Shankar and Teppala, 2012; Bae et al., 2012) e il diabete (Shankar and Teppala, 2011, Lang et al., 2008, Silver et al., 2011).

Alcuni studi indicano che il BPA può contribuire allo sviluppo della steatosi epatica, patologia caratterizzata da un accumulo di lipidi nel fegato, che può poi progredire verso l'infiammazione ed infine la fibrosi/cirrosi (Adams et al., 2005). L'eziopatogenesi di tale patologia è multifattoriale: obesità, diabete di tipo 2 e ipertrigliceridemia sono spesso associati con la sua comparsa (Ubert et al., 2009). Il Bisfenolo A può stimolare l'accumulo di grassi nella cellula epatica attraverso l'espressione di proteine che regolano il metabolismo delle goccioline lipidiche (v. figure 1.1, 1.2 a,b).

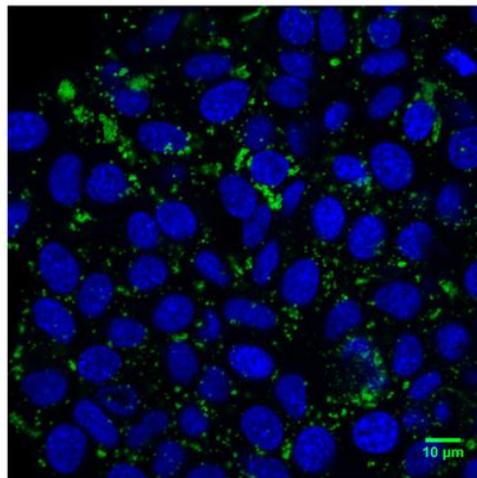


Figura 1.1: accumulo di lipidi nelle cellule del fegato umano HepG2 esposte a BPA (Huc et al., 2012)

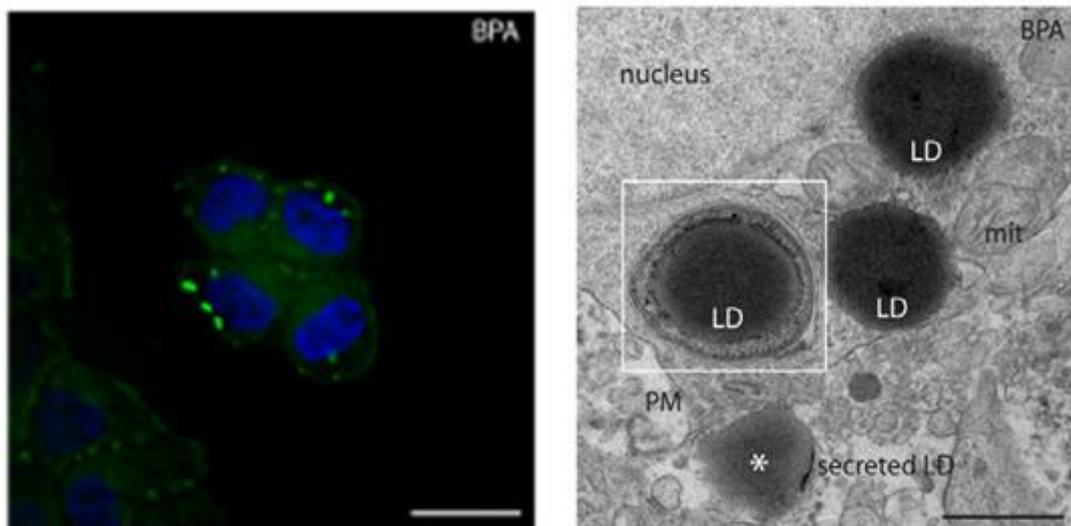


Figura 1.2 a (sin): alla concentrazione di BPA di 300 ng/mL si ha un aumento del contenuto di lipidi neutri nelle cellule epatiche di ratto (Grasselli et al., 2013). La barra dimensionale corrisponde a 1 μm.

Figura 1.2 b (des): goccioline lipidiche (Lipid Droplets) in cellule epatiche di ratto esposte a BPA (Grasselli et al., 2013).

Il bisfenolo A può avere effetti nocivi sul cuore: stimolando la concentrazione degli estrogeni modifica il controllo delle concentrazioni di calcio libero dentro le cellule del cuore femminili. Esso provoca un aumento del rilascio di calcio dal reticolo sarcoplasmatico (la parte del muscolo cardiaco che immagazzina e rilascia gli ioni di calcio), rilascio che è la causa delle aritmie, le quali possono avere altre conseguenze dannose, in particolare possono portare a infarti (Yan et al., 2011).

1.8 Meccanismo di azione del BPA come interferente endocrino

La conoscenza dei meccanismi di azione del BPA è un elemento importante da considerare per poter trasporre per gli esseri umani gli effetti osservati negli animali. Il BPA è noto per essere un debole agonista dei recettori α e β dell'estradiolo (posto pari a 1 il potenziale della molecola di 17β -Estradiolo, il potere estrogeno del Bisfenolo A è di $2 \cdot 10^{-6}$) (Metcalf et al., 2001). Il BPA agisce come un composto mimetico di E2 (ormone 17β -estradiolo) in presenza di ER α , inducendo la proliferazione di cellule cancerose, e come antiestrogeno in presenza di ER β , bloccando completamente gli effetti protettivi esercitati dal complesso E2:ER β sulla crescita tumorale. Tali risultati mettono in luce un ulteriore livello di complessità nei meccanismi molecolari alla base degli effetti del BPA nell'indurre la proliferazione di cellule di cancro. Inoltre, questo composto, silenziando selettivamente le attività di ER β , potrebbe determinare effetti deleteri maggiori in quei tessuti in cui il complesso E2:ER β esercita un'influenza protettiva, quali il sistema nervoso e il colon (Bolli et al., Dipartimento di Biologia, Università "Roma TRE", PROGETTO PREVIENI).

Non tutti i meccanismi di azione del BPA sono conosciuti, tuttavia, un numero crescente di studi in vitro o molecolari suggeriscono che l'interpretazione degli effetti tossicologici del BPA non può essere limitata al classico meccanismo estrogenico (NTP-CERHR, 2008).

Il BPA infatti può interagire anche con altri recettori cellulari come il recettore agli androgeni (AR) causando un moderato effetto antagonista (Kitamura 2005; Sun 2006), con il recettore arilico (AhR), con il recettore transmembrana per gli estrogeni, con il recettore nucleare per l'ormone tiroideo (TH) con effetto antagonista, e con il recettore transmembrana GPR30 che è coinvolto nella proliferazione cellulare (Bonaccorsi et al., 2008; INSERM 2011; Iordanidou et al., 2010).

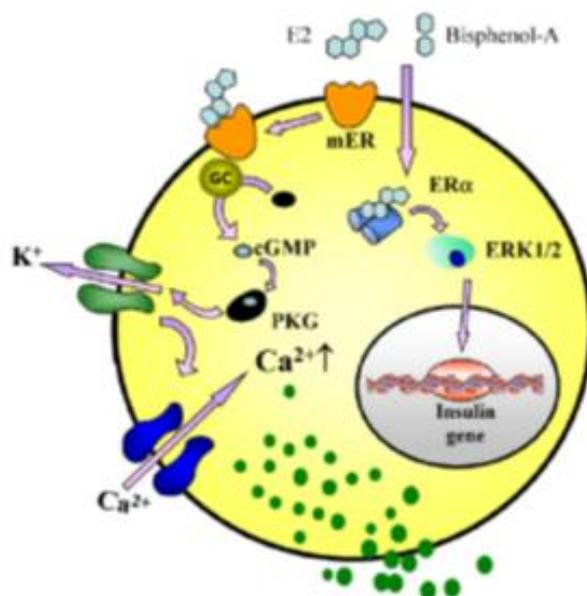
Inoltre, il BPA è in grado di indurre l'espressione del recettore nucleare coinvolto nella proliferazione di PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma): questo recettore appartiene alla famiglia dei recettori nucleari per gli ormoni che regolano l'espressione di molti geni coinvolti nel metabolismo lipidi e degli zuccheri. È particolarmente espresso nel tessuto adiposo, nel fegato e nella muscolatura scheletrica. Negli adipociti PPAR γ -2 promuove l'immagazzinamento degli acidi grassi e reprime l'espressione dei geni che inducono la lipolisi, aumentando il contenuto dei trigliceridi nel

tessuto adiposo. PPAR γ -2 promuove inoltre l'espressione di alcuni geni implicati nella regolazione della sensibilità all'insulina. (Bishop-Bailey et al., 2000; Kwintkiewicz et al., 2010).

Ci sono prove che il bisfenolo A funzioni come un perturbatore endocrino legandosi fortemente al recettore per gli estrogeni ERR- γ (Matsushima et al., 2007). ERR- γ è un recettore affine all'estradiolo, che tuttavia mostra una affinità ancora superiore al BPA. Diverse espressioni di ERR- γ in diverse parti dell'organismo possono giustificare vari effetti diversi del BPA. Per esempio, ERR- γ è stato trovato ad alte concentrazione nella placenta, organo dove è stato documentato un accumulo di bisfenolo A (Takeda et al., 2009).

Per quanto riguarda l'effetto del BPA correlato alla insorgenza del diabete di tipo II è stato descritto il modello riportato in (figura 1.3): il BPA può legarsi ai recettori di membrana dell'estradiolo nelle cellule pancreatiche beta e causare un rilascio incontrollato di insulina: in questo modo le cellule bersaglio dell'insulina nell'organismo, essendo esposte a livelli troppo alti di insulina per un tempo prolungato, divengono insulino-resistenti, e si ha un eccesso di glucosio ematico tipico del diabete di tipo 2. Il BPA può interferire anche aumentando direttamente la glicemia: ciò avviene perché si lega anche ai recettori agli estrogeni delle cellule pancreatiche alfa, determinando il rilascio di glucagone, che agendo sul fegato stimola la demolizione delle riserve di glicogeno e quindi il rilascio di glucosio in eccesso nel sangue, al quale l'organismo reagisce con una produzione maggiore d'insulina aggravando ulteriormente il fenomeno.

Figura 1.3: schema delle cellule beta del pancreas in cui il BPA causa rilascio di insulina



1.9 Regolamentazione della sostanza

Il bisfenolo A è stato normato attraverso vari provvedimenti:

- Direttiva 2008/105/CE: il bisfenolo A è presente nell'allegato III, che contiene l'elenco delle sostanze soggette a riesame per l'eventuale classificazione come sostanze prioritarie o sostanze pericolose prioritarie.
- Regolamento CE n. 1223/2009 che vieta l'utilizzo di BPA nei prodotti cosmetici in quanto fa parte dell'elenco di sostanze vietate dal REACH: *“considerate le proprietà pericolose delle sostanze classificate come cancerogene, mutagene o tossiche per la riproduzione (CMR), di categoria 1A, 1B e 2, ai sensi del regolamento CE n. 1272/2008 (REACH), del 16 dicembre 2008, relativo alla classificazione, all'etichettatura e all'imballaggio delle sostanze e delle miscele, il loro utilizzo nei prodotti cosmetici dovrebbe essere vietato”*.
- Regolamento 321/2011/UE che modifica il regolamento 10/2010/UE per quanto riguarda le restrizioni d'uso del bisfenolo A nei biberon di plastica: dal 1° maggio 2011 è vietata la fabbricazione e dal 1° giugno 2011 l'immissione sul mercato e l'importazione nella UE di biberon in policarbonato contenenti bisfenolo A.
- Regolamento CE n. 1935/2004 stabilisce i requisiti generali dei materiali a contatto con gli alimenti. Il principio alla base del presente regolamento è che *i materiali o gli oggetti destinati a venire a contatto, direttamente o indirettamente, con i prodotti alimentari devono essere sufficientemente inerti da escludere il trasferimento di sostanze ai prodotti alimentari in quantità tali da mettere in pericolo la salute umana o da comportare una modifica inaccettabile della composizione dei prodotti alimentari o un deterioramento delle loro caratteristiche organolettiche”*.

L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), che si occupa della valutazione dei rischi relativi alla sicurezza di alimenti e mangimi, ha concluso una prima valutazione del rischio del BPA nel 2006 e ha fissato per questa sostanza una dose giornaliera tollerabile (DGT o TDI) di 0,05 milligrammi/chilogrammo di peso corporeo/giorno. La DGT è una stima della quantità di una sostanza, espressa in base al peso corporeo, che può essere ingerita ogni giorno per tutta la vita senza rischi apprezzabili. L'EFSA ha inoltre valutato l'assunzione di BPA da cibi e bevande per adulti, per neonati e per

bambini e ha riscontrato che in ciascuno dei casi essa era al di sotto della DGT.

L'EFSA ha pubblicato pareri scientifici sul BPA nel gennaio 2007, nel luglio 2008 e nel settembre 2010. Nel febbraio 2012, alla luce di nuovi sviluppi scientifici, gli esperti dell'EFSA hanno deciso di condurre una nuova valutazione completa dei rischi per la salute umana associati all'esposizione al BPA attraverso la dieta, tenendo conto anche del contributo delle fonti non alimentari all'esposizione complessiva alla sostanza. Il nuovo parere dell'EFSA che dovrebbe essere ultimato nel maggio 2013, analizzerà gli elementi incerti collegati alla possibile rilevanza per la salute umana di taluni effetti associati al BPA osservati nei roditori a bassi dosaggi.

1.10 E' possibile ridurre l'esposizione al BPA?

L'idea di eliminare in toto l'esposizione BPA è irrealizzabile, ma le autorità preposte alla regolamentazione stanno adottando provvedimenti atti a tutelare i gruppi più vulnerabili: ad esempio, nel 2011 l'Unione europea ha vietato la produzione (maggio) e la vendita (giugno) di biberon in policarbonato contenenti BPA. Nel frattempo è possibile cercare di ridurre l'esposizione al BPA seguendo alcuni accorgimenti, quali:

- ⤴ non usare contenitori alimentari in policarbonato nel microonde. Il policarbonato è forte e durevole, ma con l'usura causata dal tempo e dalle temperature elevate potrebbe rilasciare BPA;
- ⤴ ridurre l'uso di cibi in scatola, in particolare i cibi caldi o liquidi. Optare, invece, per vetro, porcellana o contenitori di acciaio inox senza rivestimenti interni in plastica;
- ⤴ se si vive in un paese extra-UE, scegliere biberon privi di BPA;
- ⤴ quando si usa una bottiglia di acqua in plastica, non ri-utilizzarla più volte;
- ⤴ adottare una accurata igiene orale in modo da ridurre la necessità di cure dentali;
- ⤴ indossare i guanti se si maneggiano molti scontrini in carta termica;
- ⤴ quando si acquista un prodotto di plastica, controllare il numero che compare stampigliato sul fondo. Evitare le plastiche numero 3, 6 e 7: si tratta di materiali contenenti PVC, polistirene e BPA.

1.11 Il Bisfenolo A nella matrice suolo

Le fonti primarie di BPA nel suolo sono l'impiego in agricoltura di fanghi di depurazione o biosolidi (Lemos et al., 2009; Clarke e Smith, 2011), e l'irrigazione di terreni agricoli con acqua proveniente da impianti di trattamento delle acque reflue (Chen et al., 2011). Gli studi in cui sono stati campionati sia acque superficiali che sedimenti riportano concentrazioni di BPA molto più elevate nei sedimenti che nella colonna d'acqua (Flint et al., 2012). La presenza di BPA nel suolo risulta correlata alla densità di popolazione, come diretta conseguenza dell'elevata quantità di rifiuti contaminati (Kang 2006). Sulla base dei valori di log K_{oc} compresi tra 2,50-4,5 (Ballard et al., 2005; Fent et al., 2003; Heemken et al., 2001; Howard 1989), si pensa che il BPA abbia una moderata affinità per la materia organica del suolo ed è quindi poco probabile che sia mobile o biodisponibile nel suolo (Fent et al., 2003; Howard 1989). Tuttavia, la mobilità può essere influenzata dalla chimica del suolo e dalla tessitura. Ci sono studi che evidenziano un maggiore assorbimento di BPA in presenza di ferro, cadmio, piombo (Li et al., 2007; Zeng et al., 2006). Loffredo e Senesi (2006) hanno documentato un rapido e completo desorbimento del BPA nei terreni sabbiosi, acidi. Il rapido desorbimento in questo tipo di suoli potrebbe causare un rilascio di BPA nelle acque sotterranee, e una possibile contaminazione della falda acquifera.

In condizioni aerobiche il BPA degrada rapidamente senza una fase di latenza nel suolo, probabilmente a causa di una comunità microbica più attiva e diversificata e più ricchi nutrienti nel terreno. Invece in condizioni anaerobiche, per esempio nei sedimenti estuarini, non è stata osservata nessuna perdita di BPA, indicando che questa sostanza si accumula in ambienti anossici (Voordeckers et al., 2002).

Bisfenolo-A, ottilfenolo, nonilfenolo, estrone, estradiolo e etinilestradiolo degradano in suoli aerobici con una emivita inferiore a 7 giorni (Kookana e Ying, 2005). Tuttavia i risultati ottenuti da uno studio recente indicano che l'emivita del BPA potrebbe essere più lunga del previsto, probabilmente a causa delle continue e reiterate esposizioni attraverso le diverse fonti, alimentari e non, nonché ad una certa persistenza nei tessuti corporei (Stahlhut et al., 2009). L'emivita di degradazione del BPA nella matrice suolo è stata stimata in 30 giorni (Report Unione Europea 2003). Nonostante si degradi relativamente velocemente, le continue esposizioni permettono al BPA di bioaccumulare in vari organismi, soprattutto nei pesci (Liu et al., 2012; Lee et al., 2004), in alcuni molluschi

(Heinonen et al., 2002), e nelle rane (Kopenen et al., 2007). Alcuni studi indicano che il BPA può accumularsi nel benthos e in piante riparie (Takahashi et al., 2003) e addirittura in alcune piante destinate al consumo umano, per esempio in radici e germogli di fave e pomodori (Ferrara et al., 2006). Questo aspetto preoccupa perché il BPA può entrare a più livelli nella catena trofica e di conseguenza nella catena alimentare umana.

1.12 Tutela del suolo

Il suolo svolge importanti funzioni ambientali, economiche, sociali e culturali. La sua tutela e la sua gestione sono pertanto meritevoli di grande attenzione. A livello europeo non esiste ancora una politica specifica per la salvaguardia del suolo; in ambito italiano l'argomento è stato trattato solo in maniera frammentaria, focalizzando l'attenzione su problemi come rischio idrogeologico, discariche, riciclo di fanghi di depurazione in agricoltura, acque superficiali e sotterranee.

Nel 2002 la Commissione Europea ha adottato la Comunicazione "Verso una Strategia Tematica per la Protezione del Suolo". Nella Comunicazione al suolo viene riconosciuto lo svolgimento di molte funzioni vitali dal punto di vista ambientale, quali la produzione di biomassa, lo stoccaggio e la trasformazione di elementi minerali, organici e di energia, il filtro per la protezione delle acque sotterranee e lo scambio di gas con l'atmosfera. Inoltre il suolo rappresenta il supporto alla vita e agli ecosistemi, è riserva di patrimonio genetico e di materie prime, custode della memoria storica, nonché elemento essenziale del paesaggio. Per consentire al suolo di svolgere tali funzioni è necessario difenderlo dai processi di degrado che lo danneggiano e che sono individuati dalla Comunicazione: erosione, diminuzione di materia organica, contaminazione locale e diffusa, impermeabilizzazione, compattazione, diminuzione della biodiversità, salinizzazione, frane e alluvioni. Nel 2003 la Commissione ha dato il via allo sviluppo della Strategia Tematica per la Protezione del Suolo (STS - Soil Thematic Strategy), attraverso l'istituzione di Gruppi Tecnici di Lavoro per l'elaborazione di raccomandazioni sulle diverse tematiche/minacce individuate.

In seguito all'emanazione dei rispettivi rapporti tecnici e alla consultazione con i portatori di interesse e con gli Stati Membri, nel settembre 2006 la Commissione Europea, al fine di dare seguito alla strategia stessa, ha adottato una serie di strumenti:

- Proposta di Direttiva Quadro per la Protezione del Suolo (SFD - Soil Framework Directive);
- Comunicazione della Commissione;
- Valutazione di impatto.

Tali strumenti, ed in particolare la proposta di direttiva, sono attualmente in fase di esame da parte degli Stati Membri. Nell'ambito della proposta di Direttiva sono indicate le seguenti misure:

- istituzione di un quadro comune per la difesa del suolo;
- obbligo di individuare, descrivere e valutare l'impatto di alcune politiche settoriali sui processi di degrado del suolo;
- obbligo per i proprietari di terreni di adottare misure di prevenzione del degrado dei suoli;
- approccio al fenomeno dell'impermeabilizzazione del suolo;
- individuazione delle aree a rischio di:
 - erosione;
 - diminuzione di materia organica;
 - compattazione;
 - frane;
- istituzione di programmi nazionali di misure;
- istituzione di un inventario dei siti contaminati e di un meccanismo di finanziamento per bonifica dei siti "orfani" (con modifica della direttiva 2004/35/CE) e formulazione di una strategia nazionale di bonifica dei siti contaminati individuati;
- definizione di "sito contaminato";
- elenco di attività potenzialmente inquinanti per il suolo;
- obbligo, per i venditori o i potenziali acquirenti di terreni, di fornire un rapporto sullo stato del suolo per ogni compravendita di terreni in cui siano avvenute o siano in corso attività potenzialmente inquinanti.

La normativa riguardante il suolo in Italia è poco sviluppata se confrontata con quella delle altre matrici ambientali, poiché non è presente una legge quadro che tratti in maniera completa il tema.

Il D.Lgs 22/97 (Decreto Ronchi) ha affrontato i problemi della bonifica dei siti contaminati e dello smaltimento dei rifiuti in discarica. Il D.M.471/99 ha trattato le

tematiche della messa in sicurezza, caratterizzazione e bonifica di un sito contaminato. Contiene specifiche indicazioni e prescrizioni in merito ai limiti di concentrazione massima delle sostanze contaminanti nelle diverse matrici ambientali, alle tempistiche ed alle attività di caratterizzazione e bonifica delle aree contaminate.

Il D.M.471/99 è stato sostituito dal D. lgs. 152/2006 (testo unico ambientale, aggiornato nel 2010), precisamente dalla parte quarta, riguardante la bonifica di siti contaminati. Il testo unico ambientale contiene anche alla parte terza norme sulla difesa del suolo e lotta alla desertificazione, che però non bastano a ricoprire gli obiettivi della lotta al degrado di questa matrice proposti dalla Commissione europea: si auspica una approvazione in tempi brevi della direttiva quadro sui suoli, allo scopo di dare consistenza alle normative nazionali sui siti contaminati già in vigore.

1.13 Il biomonitoraggio del suolo

Il suolo è stato di gran lunga la matrice ambientale più trascurata poiché la maggior parte degli studi pubblicati negli ultimi anni si è focalizzata sui contaminanti emergenti presenti nelle acque. Da qualche anno a questa parte, in parallelo con una aumentata consapevolezza e con un costante aggiornamento delle tecniche analitiche, il suolo è stato indagato maggiormente, valutando non solo la concentrazione degli inquinanti, ma anche il meccanismo di esposizione e le implicazioni tossicologiche ed ecotossicologiche per gli organismi bioindicatori. Oggi, anche sulla base di linee guida internazionali (OECD, OCSE) e a studi finanziati dalla UE (NEWGENERIS, PHIME, BIOCOP, NOMIRACLE, INTARESE, HEIMSTA , 2-FUN), le strategie per la valutazione delle alterazioni di un ecosistema si basano sempre di più sull'integrazione delle analisi chimiche con una serie di indicatori biologici.

L'uso di organismi sensibili agli stress ambientali si è reso necessario in quanto i dati di tipo chimico-fisico non davano una visione globale del possibile impatto ambientale, ma fornivano solamente una misura puntiforme ed istantanea di un unico parametro. Inoltre, uno strumento di misura rileva solo le sostanze per le quali è stato appositamente progettato e non è in grado di evidenziare sostanze impreviste o gli effetti combinati di più sostanze sull'ambiente. Per contro la biovalutazione fornisce stime indirette, ma è in grado di mostrare gli effetti sinergici di più sostanze su più bioindicatori, consentendo

valutazioni incrociate (Biagini et al., 2006).

Il monitoraggio di un ampio numero di effetti precoci (biomarker) in organismi sentinella (bioindicatori) permette di determinare la biodisponibilità ed il bioaccumulo degli inquinanti, fornendo una risposta integrata degli ecosistemi ai fattori di stress ambientale. Questo approccio di biomonitoraggio, determinando segnali di allarme precoce, permette di prevedere con anticipo l'impatto ambientale, offrendo un utile strumento all'individuazione di fonti inquinanti ed alla programmazione di adeguate misure di protezione.

Il monitoraggio biologico del suolo, o biomonitoraggio, è rivolto alla valutazione della qualità del suolo mediante l'utilizzo di organismi viventi.

Gli organismi utilizzati come strumenti di indagine del biomonitoraggio devono presentare una specifica sensibilità verso determinati fattori di disturbo ambientale e vengono definiti "biosensori".

Un biosensore, a seconda delle specifiche caratteristiche, può essere impiegato come bioindicatore o come bioaccumulatore.

1.14 I Bioindicatori

Bioindicatore è un organismo vivente o una specifica comunità vegetale o animale che, in presenza di un inquinante o miscele di inquinanti, subisce variazioni rilevabili dello stato naturale.

Tali variazioni possono portare alla modifica della struttura della comunità nonché alla morte dell'organismo. Un organismo può quindi essere considerato un buon bioindicatore qualora esista una relazione tra risposta biologica ed entità dell'esposizione ad un dato inquinante.

I principali endpoint presi in considerazione sono generalmente i seguenti:

1. variazioni nella struttura della comunità;
2. modificazioni morfologiche;
3. variazioni della vitalità (modificazioni fisiologiche);
4. danni al patrimonio genico.

Un buon bioindicatore dovrebbe possedere le seguenti caratteristiche:

- △ sensibilità agli inquinanti;
- △ ampia distribuzione nell'area di indagine;
- △ scarsa mobilità;
- △ lungo ciclo vitale;
- △ uniformità genetica;
- △ facile reperibilità e manipolazione;
- △ facilità di allevamento in laboratorio.

E' molto importante conoscere la biologia e la fisiologia del bioindicatore per non confondere variazioni assolutamente naturali con effetti tossici.

1.15 I lombrichi come bioindicatori negli ecosistemi terrestri

La fauna del suolo è un importante componente degli ecosistemi edafici in quanto è coinvolta in numerosi aspetti della decomposizione della sostanza organica, contribuisce alla regolazione dell'attività microbica, del ciclo dei nutrienti e della struttura del suolo.

La fauna edafica impiegata nel monitoraggio degli inquinanti nei suoli include Nematodi, Enchitreidi, Gasteropodi, Collemboli, Isopodi, Aracnidi, Oligocheti (Cortet et al., 1999). Tra gli Oligocheti spiccano per importanza i lombrichi. Essi sono senza dubbio i componenti biotici più importanti del suolo in termini di formazione e manutenzione della sua struttura e fertilità, e le loro grandi dimensioni li rendono i maggiori costituenti della biomassa di invertebrati nel suolo. Aristotele fu uno dei primi a richiamare l'attenzione sul ruolo dei lombrichi, da lui giustamente chiamati gli "intestini della Terra". Come dimostrò Charles Darwin nel suo libro del 1881, "La Formazione di terra vegetale per azione dei vermi, con osservazioni sulle loro abitudini", le attività dei lombrichi hanno un effetto benefico sul suolo: per alimentarsi il lombrico ingerisce terreno contenente detriti vegetali e altre sostanze organiche, che il suo apparato digerente trita e omogeneizza prima di evacuarlo con deiezioni terrose, visibili sotto forma di montagnole, che costituiscono un humus assai favorevole allo sviluppo dei vegetali. Inoltre con il loro movimento, i lombrichi scavano gallerie frantumando il suolo, permettendo così l'aerazione e il rimescolamento delle sue componenti. I cunicoli scavati sia in orizzontale che in verticale aumentano la porosità, permettendo un maggiore drenaggio delle acque e una migliore penetrazione delle radici delle piante. Il suolo è portato dalla profondità alla superficie sotto forma di masse fecali, mentre il materiale organico passa dalla superficie a livelli inferiori, aumentando la fertilità del terreno.

I lombrichi rendono i nutrienti del terreno maggiormente biodisponibili, e le loro feci contengono fino a 5 volte più azoto, 7 volte più fosforo e 11 volte più potassio della terra circostante. Con questo eccellente concime forniscono un contributo sostanziale all'approvvigionamento di sostanze nutritive delle piante. Questi organismi sono sfruttati spesso per la loro capacità di trasformare la materia organica, in quanto grazie al loro utilizzo (vermicompostaggio) è possibile produrre fertilizzante a partire dalle deiezioni animali.

I lombrichi sono considerati ottimi bioindicatori dello stato di salute del suolo perché sono onnipresenti e resilienti, sensibili a un gran numero di contaminanti, hanno un alto

tasso riproduttivo e un ciclo di vita relativamente lungo, sono resistenti a una vasta gamma di temperature e umidità, possono essere facilmente allevati e manipolati, sono a diretto contatto col substrato in cui vivono, e ne ingeriscono grandi quantità. Inoltre non sono rivestiti di cuticola e possono quindi assorbire inquinanti direttamente attraverso la superficie corporea. Potrebbero essere considerati gli equivalenti terrestri degli organismi acquatici filtratori. La risposta dei lombrichi ad un inquinante tossico non si limita alla mortalità, ma prima sono influenzati anche il tasso di crescita, la riproduzione e il comportamento; sono anche in grado di accumulare alcuni inquinanti, come i metalli, nei loro tessuti. Le vie di esposizione dei lombrichi ai contaminanti presenti nel suolo sono rappresentate prevalentemente dall'assorbimento dell'acqua interstiziale attraverso la superficie corporea, e in misura minore dall'ingestione del suolo e della sostanza organica in esso presente e dalla respirazione dell'aria interstiziale.

1.16 Ecologia dei lombrichi

I lombrichi sono Anellidi appartenenti alla classe dei Clitellati e alla sottoclasse degli Oligocheti.

Secondo Reynolds e Wetzel (2004), ci sono più di 8300 specie di Oligocheti, di cui circa la metà sono lombrichi terrestri. I vermi terricoli appartenenti alla famiglia dei Lombricidi, in particolare le specie *Allolobophora caliginosa*, *Eisenia foetida*, *Eisenia andrei* sono le più presenti nella pedofauna europea.

I lombrichi sono organismi dal corpo cilindrico allungato e diviso in segmenti, a simmetria bilaterale, con una ghiandola esterna dalla forma ad anello rigonfio (clitello) che si trova dietro i pori genitali e che ha la funzione di produrre le uova (secrete in bozzoli), un lobo sensoriale davanti alla bocca (prostomio), e un ano alla fine del corpo animale, con un piccolo numero di setole su ciascun segmento. Assumendo condizioni favorevoli, essi raggiungono la maturità sessuale in un arco di tempo compreso tra due mesi e un anno di vita. Gli individui sessualmente maturi possono essere facilmente distinti dalla presenza del clitello, che può essere di colore più o meno scuro rispetto al resto del corpo (Dominguez e Edwards, 2011).

I lombrichi sono animali ermafroditi insufficienti che praticano la fecondazione incrociata all'interno dei bozzoli. Il clitello, pochi giorni dopo l'accoppiamento, secerne il bozzolo, e le cellule della ghiandola clitellare producono un liquido nutritivo albuminoso che riempie il bozzolo. Il bozzolo pieno di albume scivola in avanti mentre il verme si ritrae, successivamente passa prima sui gonopori femminili, dove le uova sono liberate all'interno del bozzolo, poi passa ai ricettacoli seminali, dai quali sono liberati gli spermatozoi: così le uova subiscono la fecondazione incrociata.

I bozzoli, che sono di forma ovoidale e di colore bruno-giallastro, sono solitamente depositati vicino alla superficie del suolo, tranne in periodi di siccità quando possono essere depositati in strati più profondi. In condizioni favorevoli, i lombrichi possono accoppiarsi continuamente durante la primavera e formare bozzoli ogni tre o quattro giorni. Le uova si schiudono dopo un periodo di incubazione che varia a seconda della specie di lombrico e delle condizioni ambientali.

1.17 Ecologia di *Eisenia andrei*



Figura 1.4 *Eisenia andrei*

Eisenia andrei, il comune verme rosso (figura 1.4), è una delle specie di Lombrichi più diffuse in Europa, e si trova soprattutto in ambienti limosi e argillosi, in climi temperati. E' una specie epigea e vive solo in presenza di molta materia organica: per questo motivo è diffusa nel compost, mentre non si trova frequentemente in campo. La temperatura ottimale per la crescita di questa specie è tra i 18 e i 25°C, e sebbene possa tollerare una vasta gamma di condizioni di umidità, l'umidità ottimale è 85%.

Il ciclo di vita e la biologia delle popolazioni di *E. andrei* sono stati studiati da diversi autori (Watanabe e Tsukamoto 1976; Hartenstein et al., 1979; Edwards 1988, Reinecke e Viljoen 1990; Domínguez et al., 1997; Domínguez e Edwards 1997; Domínguez et al., 2000; Monroy et al., 2006). In condizioni ottimali la durata del loro ciclo di vita (dalla posa del bozzolo al lombrico adulto) varia da 45 a 51 giorni. Il tempo necessario ai neonati per raggiungere la maturità sessuale varia da 21 a 30 giorni. La posa del bozzolo inizia 48 ore dopo l'accoppiamento, e il tasso di produzione dei bozzoli è di 0,35-0,5 al giorno. La vitalità dopo la schiusa è del 72% -82%, e il periodo di incubazione può durare dai 18 a 26 giorni. Il numero di neonati per bozzolo varia da 2 a 4 a seconda della temperatura. In condizioni controllate, la vita media è di 594 giorni a 18 ° C e 589 giorni a 28 ° C, con una speranza di vita massima tra 4,5 e 5 anni, anche se in condizioni naturali può essere molto più breve. Il peso medio di un verme adulto è di 0,55 g e la taglia media è 4–8 mm × 50–100 mm. (Dominguez e Edwards, 2011).

Le linee guida OECD suggeriscono di utilizzare *Eisenia andrei* come bioindicatore per determinare la genotossicità di alcuni contaminanti del suolo, prelevando come tessuto target i celomociti. I celomociti, cellule con potenzialità di fagocitosi ed immunitarie, sono particolarmente esposti agli inquinanti ed essendo facilmente prelevabili con meccanismo di estrusione, possono essere considerati come tessuto surrogato per la determinazione dei biomarker.

1.18 I biomarker

La tossicità di una sostanza è una caratteristica sia qualitativa, poiché l'azione tossica dipende dall'interazione con le molecole biologiche, che quantitativa, dato che i suoi effetti si manifestano solo quando vengono superati determinati livelli di concentrazione nell'ambiente o nei tessuti dell'organismo.

L'obiettivo cui classicamente si tende nel misurare la tossicità di una sostanza è l'individuazione di una dose alla quale essa è capace di produrre uno o più effetti negli organismi tenuti in condizioni controllate, nelle quali siano note la concentrazione del composto tossico e la durata dell'esposizione. Tuttavia l'ambiente naturale pone severe limitazioni all'applicabilità di test tradizionali ed alle deduzioni riguardanti la valutazione del rischio ambientale poiché gli organismi, in un ambiente inquinato, sono di solito esposti a miscele complesse di sostanze chimiche potenzialmente tossiche, i cui effetti additivi, antagonisti e sinergici, possono difficilmente essere quantificati.

La comprensione degli eventi molecolari e cellulari che si verificano tra l'esposizione e la comparsa di effetti biologici osservabili è fondamentale se si vuol ottenere una buona interpretazione del rischio ambientale e sanitario associato alla presenza di xenobiotici.

In questo contesto, l'utilizzo dei biomarcatori (*biomarker*) è un utile strumento per la sorveglianza ambientale, che può fornire indicazioni predittive circa lo sviluppo di una situazione a rischio.

Un *biomarker* è definito come una "variazione, indotta da un contaminante, a livello delle componenti biochimiche o cellulari di un processo, di una struttura o di una funzione, che può essere misurata in un sistema biologico". (Depledge, 1994). Alla base dell'utilizzo di biomarcatori per lo studio degli effetti della contaminazione chimica e la valutazione della qualità dell'ambiente, è fondamentale la comprensione della relazione dose/effetto (Depledge, 1994). La costruzione di curve dose/effetto è basata su studi condotti in laboratorio, nei quali l'organismo è esposto ad una singola sostanza e viene misurata una sola risposta (*biomarker*) ad una serie di dosi.

Nell'ambiente naturale, non è verosimile che si abbia un'unica relazione dose/effetto, che possa permettere la previsione dell'entità della risposta sulla base della dose del composto chimico preso in esame. È più ragionevole pensare ad una "famiglia" di relazioni dose/effetto, ognuna corrispondente a diverse combinazioni e permutazioni di sostanze chimiche interagenti e stress ambientali (Peakall e Shugart, 1993).

La premessa di questo concetto è stata formulata da Depledge (1989): un organismo nel suo ambiente tende a mantenere l'omeostasi. Quando è esposto a contaminanti, quindi, diventano attivi i meccanismi compensatori e si ha un aumento o una riduzione in uno o più processi, funzioni fisiologiche o cambiamenti strutturali. Ognuna di queste risposte può essere un *biomarker* e, come tale, indicare che è avvenuta l'esposizione. Se l'esposizione continua, o aumenta, i meccanismi compensatori dell'organismo vengono sopraffatti, insorge il danno e diventano attivi i meccanismi di riparazione fisiologica.

Nell'approccio multi-risposta, o multi-livello, lo scopo della misurazione dei *biomarker* non è tanto definire quantitativamente la dose dei diversi agenti tossici alla quale un organismo è stato esposto, ma, piuttosto, determinare in che punto si trova la popolazione nel *continuum* tra la normale omeostasi e la malattia.

L'uso simultaneo di una batteria di *biomarker*, disposti lungo la linea di allontanamento dalla risposta normale, offre, in questo caso, possibilità maggiori rispetto allo studio di un unico *biomarker* e mette a disposizione un precoce segnale d'allarme sulla pericolosità dell'esposizione ad un contaminante o ad una miscela di contaminanti. L'utilizzo di *biomarker* multipli può, inoltre, fornire informazioni sulla relazione esistente tra le varie risposte osservate e, quindi, sul meccanismo (o i meccanismi) d'azione tossica dei contaminanti presi in considerazione.

1.19 Batteria di biomarker utilizzati per il lombrico *Eisenia andrei*

Uno degli obiettivi di questa tesi è stato utilizzare una “batteria” di biomarker capaci di fornire indicazioni sugli eventuali effetti biologici del bisfenolo A nell’organismo sentinella *Eisenia andrei*. I biomarker scelti per la batteria impiegata in questo lavoro sono i seguenti:

- stabilità delle membrane lisosomiali: saggio del tempo di ritenzione del rosso neutro (NRRA): biomarker generico;

Biomarker istochimici:

- accumulo di lipofuscine (LIF) nei lisosomi: biomarker generico, che segnala stress ossidativo;
- accumulo di lipidi neutri insaturi (LIP) nei lisosomi: biomarker generico, indice di alterazioni del metabolismo.

Biomarker enzimatici:

- attività dell’enzima Acetilcolinesterasi (AChE): biomarker di neurotossicità specifico per insetticidi organofosforici e carbammati;
- attività dell’enzima Catalasi (CAT): biomarker che indica l’attivazione di risposte antiossidanti;
- attività delle Glutathione-S-Transferasi (GST): biomarker che indica l’attivazione di meccanismi di detossificazione;
- contenuto in Malondialdeide (MDA): biomarker di perossidazione lipidica.

1.20 Stabilità delle membrane lisosomiali

I lisosomi sono piccoli organelli cellulari prodotti dall'apparato del Golgi che svolgono un'azione digestiva e detossificante all'interno delle cellule. Idrolizzano tutti i tipi di macromolecole ovvero proteine, lipidi, carboidrati, acidi nucleici e anche sostanze xenobiotiche, grazie alla presenza al loro interno di svariati enzimi.

Le caratteristiche principali dei lisosomi sono:

- un ambiente intravesicolare acido (tramite misurazioni condotte in vitro si stima che il pH ottimale dei lisosomi sia attorno a 3.5-5);
- la presenza di enzimi con attività ottimale a pH acido.

La principale classe di enzimi contenuti in questi organelli sono le idrolasi lisosomiali, in grado di rompere un legame covalente utilizzando una molecola di acqua. Questi enzimi sono coinvolti nella degradazione delle molecole esterne alla cellula che vengono internalizzate attraverso l'endocitosi.

I lisosomi non svolgono solo l'idrolisi di macromolecole, ma sono coinvolti anche nella degradazione di componenti cellulari ormai senescenti e nella autodigestione della cellula stessa.

Nei lisosomi non si producono solo rifiuti causati dalla degradazione delle macromolecole, ma parte delle molecole ottenute vengono riciclate e trasportate ai compartimenti dove esse sono necessarie per la sintesi di nuovi prodotti. Dato che tutti i processi di sintesi e distruzione di macromolecole costano in termini di ATP, tutto ciò che può essere recuperato corrisponde ad un risparmio energetico per la cellula.

Gli enzimi idrolitici dei lisosomi agiscono solo su sostanze assunte al loro interno, quindi la membrana di questi organuli funge da barriera rispetto al citoplasma.

Le risposte lisosomiali all'esposizione a xenobiotici o, più in generale, allo stress ambientale, si dividono essenzialmente in tre categorie: un aumento nelle dimensioni dei lisosomi, una riduzione della stabilità di membrana, o cambiamenti nel contenuto dei lisosomi.

Molti composti tossici, come ad esempio metalli pesanti, IPA e PCB possono accumularsi in eccesso all'interno dei lisosomi, alterarne la funzionalità metabolica e destabilizzarne le membrane fino a danneggiare l'intera cellula

(Viarengo et al., 1998). Il sovraccarico dei lisosomi conduce quindi alla destabilizzazione della membrana e come estrema conseguenza si può avere la necrosi cellulare a causa del rilascio di enzimi lisosomiali degradativi.

La valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali rappresenta un'analisi importante per individuare uno stress legato alla presenza di sostanze inquinanti con cui gli organismi vengono a contatto: può essere utilizzata come biomarker, in quanto evidenzia una risposta fisiologica dell'organismo all'esposizione ad un inquinante.

1.21 Biomarker istochimici

1.21.1 Accumulo di lipofuscine nei lisosomi

Le lipofuscine sono pigmenti di derivazione lipidica presenti sia all'esterno che all'interno dei lisosomi, che si originano dall'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi di cui sono ricchi i tessuti. Sono composte da residui dell'ossidazione di lipidi e proteine, e contengono spesso metalli in tracce come ferro, rame, alluminio, calcio e manganese. Vengono anche chiamate age pigment, o pigmento dell'età e sono considerate un indicatore di invecchiamento. L'accumulo di lipofuscine può essere correlato ad una alterazione dello stato redox cellulare e può essere messo in evidenza con opportune analisi citochimiche quantitative che permettono di stimare il livello di alterazione dell'attività lisosomiale.

Sebbene le cellule rinnovino continuamente i componenti vecchi o danneggiati, la quantità di strutture inutili e/o scarsamente funzionanti aumenta con l'età (Terman, 2001). Queste strutture, che includono macromolecole alterate, mitocondri danneggiati ed altri organuli, così come la lipofuscina stessa, possono essere considerate rifiuti biologici.

Quindi la lipofuscina può essere considerata un materiale di rifiuto morfologicamente e chimicamente polimorfo originatosi da una varietà di strutture intracellulari, che si accumula nel sito primario di smaltimento rifiuti: il lisosoma.

Poiché non è degradabile dalle idrolasi lisosomiali e non può essere rimossa dalla

cellula attraverso processi di esocitosi, la lipofuscina si accumula inevitabilmente all'interno dei lisosomi delle cellule post mitotiche o che si dividono lentamente, mentre le cellule mitoticamente attive riescono a diluirla abbastanza efficientemente durante la divisione cellulare (Terman, 2001).

Sono state fornite diverse prove del fatto che lo stress ossidativo promuova la formazione della lipofuscina, indigeribile da parte degli enzimi lisosomiali mentre le difese antiossidanti la combattano (Terman e Brunk 1998, Zs-Nagy et al., 1995). Il deposito in gran quantità di lipofuscina può rendere, in definitiva, la cellula più suscettibile allo stress ossidativo, diminuisce la degradazione all'interno dei lisosomi, nonostante l'abbondanza di enzimi lisosomiali, e, infine, riduce l'adattabilità della cellula e favorisce la comparsa di varie patologie legate all'invecchiamento. Tali cambiamenti sono caratteristici, per esempio, delle malattie neurodegenerative come il morbo di Parkinson e l'Alzheimer.

L'accumulo di lipofuscina nel tessuto cloragogeno dei vermi rappresenta una risposta generale allo stress ambientale (Viarengo et al., 1990, Regoli 1992), mentre quello di lipidi neutri sembra più strettamente correlato all'esposizione a contaminanti organici (Moore 1988, Domouhtsidou e Dimitriadis 2001).

1.21.2 Accumulo di lipidi neutri insaturi nei lisosomi

I lipidi sono macromolecole che svolgono tipicamente una funzione di riserva energetica all'interno degli organismi. In concomitanza con l'aumento della concentrazione di sostanze tossiche nell'ambiente cellulare e lisosomiale, si è osservato un aumento della tendenza da parte dei lipidi neutri insaturi ad accumularsi all'interno dei lisosomi, in particolare a livello della cavità celomatica. Questo tipo di accumulo di derivati lipidici è direttamente legato all'aumento delle reazioni metaboliche attivate in risposta alla presenza di sostanze tossiche (in particolare idrocarburi aromatici) (Viarengo et al., 1998). Tale alterazione del metabolismo è in genere correlata ad una alterazione dello stato redox cellulare, e può essere messa in evidenza con una opportuna colorazione citosolica.

1.22 Biomarker enzimatici

1.22.1 Attività dell'enzima Acetilcolinesterasi (AChE)

L'acetilcolinesterasi fa parte della classe ubiquitaria di enzimi colinesterasi (ChE) presenti nel tessuto nervoso, e la sua funzione principale è quella di rimuovere l'acetilcolina idrolizzandola in colina e acido acetico. Il lavoro principale del neurotrasmettitore acetilcolina (ACh) è quello di portare il segnale dalle cellule nervose alle cellule muscolari. Quando una cellula nervosa motrice ottiene il corretto segnale dal sistema nervoso, rilascia acetilcolina nelle sue sinapsi con le cellule muscolari. Qui l'acetilcolina si lega ai recettori sulle cellule muscolari, innescando il processo di contrazione. Quando il segnale finisce, il neurotrasmettitore ACh deve essere distrutto, e questo è compito dell'enzima acetilcolinesterasi.

L'inibizione delle esterasi cerebrali (acetilcolinesterasi - AChE) rappresenta un biomarker specifico della presenza di insetticidi organofosforici (OPs) e carbammati (CBs). Questi insetticidi generano il loro effetto provocando un'inibizione, irreversibile (OPs), o reversibile (CBs), dell'attività dell'acetilcolinesterasi con conseguente accumulo di acetilcolina a livello delle sinapsi nervose, che causa un prolungamento dell'azione dell'ACh, con sintomi di tremore, disfunzioni motorie e, in casi estremi, morte. La valutazione dell'inibizione dell'AChE come segnale d'esposizione e d'effetto a tali insetticidi, si presenta come un metodo estremamente rapido, economico, e più attendibile rispetto alla più comune valutazione chimica della presenza di tali contaminanti; inoltre data la rapida velocità di degradazione di questi composti nei vari comparti ambientali, questo metodo si presta a evidenziare gli effetti dei contaminanti a breve termine sugli organismi.

1.22.2 Lo stress ossidativo

Lo stress ossidativo è una particolare condizione indotta da un'accentuazione in senso pro-ossidante dell'equilibrio dinamico fra i processi ossidativi e riduttivi che avvengono in ogni cellula con la produzione di numerose specie radicaliche. I radicali liberi sono molecole, altamente instabili e reattive, caratterizzate dalla presenza di un elettrone spaiato nel loro orbitale esterno. I radicali liberi più conosciuti sono quelli a contenuto d'ossigeno (ROS) come l'anione superossido (O_2^-) ed il perossido d'idrogeno (H_2O_2) e sono dovuti a fattori ambientali (raggi UV, inquinamento, droghe ecc...) e a fattori endogeni (trasporto di elettroni nei mitocondri, attività delle cellule fagocitarie). Le specie ossidanti ed i radicali liberi svolgono importanti ruoli fisiologici, quali la difesa nei confronti dei batteri, la trasmissione dei segnali biochimici fra le cellule, il controllo della pressione arteriosa, ecc... È solo il loro eccesso, generalmente riferito ad una o più classi di ossidanti, ad essere implicato nello stress ossidativo, oggi ritenuto associato ad oltre cento patologie umane, e giocante un ruolo fondamentale nel processo di invecchiamento. Quando le sostanze ossidanti, tra cui le specie reattive dell'ossigeno (ROS), prevalgono e/o le sostanze antiossidanti si riducono, si instaura una condizione di stress ossidativo. Il danno cellulare inizia a livello della membrana lipidica, per poi condurre ad un'alterata formazione di ATP, fino ad arrivare a modificazioni del DNA (Del Rio et al., 2005).

Gli antiossidanti sono sostanze chimiche (molecole, ioni, radicali) o agenti fisici, che rallentano o prevengono l'ossidazione, proteggendo le cellule dagli eventuali danni indotti dai radicali. Tutti gli organismi animali contengono diversi tipi di enzimi per proteggersi dagli effetti negativi degli xenobiotici: ci sono parecchi sistemi enzimatici che catalizzano le reazioni per neutralizzare i radicali liberi e le specie reattive dell'ossigeno. Questi enzimi includono:

- superossido-dismutasi (SOD)
- glutazione-perossidasi (GPX)
- catalasi (CAT)

Tali enzimi sono presenti nei tessuti di tutti gli organismi e sono fondamentali nella trasformazione dei radicali in molecole non reattive. Questa batteria di enzimi antiossidanti è supportata da sistemi accessori che forniscono equivalenti ridotti necessari per l'attività di detossificazione (glucosio 6-fosfato deidrogenasi, glutazione reductasi).

1.22.3 Catalasi (CAT)

La catalasi è un enzima, appartenente alla classe delle ossidoreduttasi, coinvolto nella detossificazione della cellula dalle specie reattive dell'ossigeno. Catalizza la rimozione dell' H_2O_2 , che viene metabolizzato ad ossigeno molecolare ed acqua:



Le catalasi catalizzano la demolizione di un prodotto molto reattivo, il perossido di idrogeno (o acqua ossigenata, H_2O_2) che si forma come intermedio nella reazione di riduzione dell'ossigeno ad acqua, essenziale nell'utilizzazione biologica dell'ossigeno stesso soprattutto ai fini della produzione di energia. Le catalasi sono pertanto presenti in quasi tutte le cellule aerobiche che, avendo bisogno dell'ossigeno per il loro metabolismo, si sono evolute sviluppando sistemi enzimatici atti a neutralizzare il rischio conseguente alla formazione di sottoprodotti potenzialmente dannosi di questo adattamento (ROS, Reactive oxygen species) (Enciclopedia della Scienza e della Tecnica, 2008). La Catalasi quindi protegge le strutture viventi dall'azione nociva dell'acqua ossigenata che continuamente si forma nei tessuti per numerosi processi chimici fisiologici. È uno dei più attivi catalizzatori biologici noti e agisce anche a basse temperature.

Negli Eucarioti la catalasi è localizzata in una particolare classe di organelli subcellulari, detti perossisomi perché specializzati nella demolizione di acidi grassi a lunga catena mediante l'azione di ossidasi che producono grandi quantità di perossido di idrogeno. La presenza di catalasi nello stesso compartimento cellulare appare chiaramente funzionale alla difesa della cellula contro questo processo metabolico.

1.22.4 Glutatione-S-Transferasi (GST)

La glutazione perossidasi (GPX) è un enzima che converte il perossido di idrogeno in acqua, implicando una contemporanea ossidazione del glutazione ridotto (GSH) nella sua forma ossidata (GSSG). Inoltre catalizza la riduzione glutazione-dipendente degli idroperossidi (ROOH) in GSSG (glutazione disolfuro) ed acqua.

Grazie alla riduzione dei perossidi, la glutazione perossidasi protegge l'organismo dai danni ossidativi e dall'accumulo dei prodotti dei radicali liberi. Tale sistema è localizzato sia nel citoplasma, che nella matrice mitocondriale (Enciclopedia della Scienza e della Tecnica, 2008).

Nella cellula, in condizioni redox normali, la maggior parte del GSH è in forma ridotta ed è distribuito nel nucleo, nel reticolo endoplasmatico e nei mitocondri. Oltre che in forma libera, il GSH, mediante un processo chiamato glutationilazione, può anche essere legato covalentemente a proteine, regolandone la funzione o fungendo da coenzima in sistemi enzimatici antiossidanti (Pompella et al., 2003).

Il GSH può agire direttamente eliminando radicali liberi e xenobiotici elettrofili, oppure può fungere da substrato per le glutazione perossidasi (GPxs) e glutazione S-transferasi (GSTs), durante i processi di detossificazione del perossido di idrogeno, di idroperossidi lipidici e di composti elettrofili.

Le glutazione S-transferasi (GSTs) sono una famiglia di isoenzimi detossificanti che catalizzano la coniugazione di varie molecole tossiche al glutazione ridotto rendendole meno reattive e più facilmente eliminabili dall'organismo (Jakoby 1978; Vidal et al., 2002; Mannervick & Danielson 1988).

Poiché molti induttori della sintesi o dell'attività delle GST sono specie inquinanti, l'espressione delle GST citosoliche in organismi sentinella può essere impiegata come indice di inquinamento dell'ambiente in cui tali organismi crescono e vivono.

1.22.5 Malondialdeide (MDA)

L'attacco da parte dei radicali liberi ai lipidi poliinsaturi presenti nelle membrane biologiche, determina l'avvio del processo di perossidazione lipidica, un processo di deterioramento O_2 dipendente che porta alla compromissione dell'integrità delle membrane biologiche (Gutteridge e Halliwell, 1989). Le molecole lipidiche più suscettibili ad un attacco radicalico sono gli acidi grassi insaturi (UFA), in particolare i poliinsaturi (PUFA) presenti nei fosfolipidi e il colesterolo.

La suscettibilità degli acidi grassi poliinsaturi all'attacco radicalico è particolarmente evidente nella distruzione delle membrane biologiche e nella formazione di lipoproteine ossidate, con la produzione di perossidi lipidici e dei loro sottoprodotti come le aldeidi. Tra queste la malonidialdeide (MDA) con formula chimica $CH_2(CHO)_2$, rappresenta uno dei maggiori prodotti terminali derivanti dalla rottura degli acidi grassi e dei relativi esteri (Uchida, 2000). E' un sottoprodotto altamente tossico generato dalla perossidazione degli acidi grassi poliinsaturi e la sua tossicità è dovuta alla rapida reazione con le proteine ed il DNA (Slatter et al., 2000).

La MDA è uno dei biomarcatori utilizzati per la valutazione della perossidazione lipidica. La stabilità e l'elevata reattività sono caratteristiche che rendono questa molecola dannosa verso altri costituenti presenti all'interno e all'esterno della cellula, come gli acidi nucleici e le proteine, causando alterazione della funzionalità cellulare (Del Rio et al., 2005). Questo composto è un aldeide reattivo, causa di citotossicità nelle cellule ed è in grado di reagire con la deossiadenosina e deossiguanina nel DNA, formando composti mutageni, precursori di carcinogenesi (Marnett, 1999). La tossicità della MDA coinvolge anche il sistema cardiovascolare, in particolar modo è implicata nei processi di aterogenesi e nell'irrigidimento del tessuto cardiaco e della parete dei vasi, data la sua interazione con le fibre di collagene (Palinski et al., 1994, Slatter et al., 2000).

La MDA si trova anche nel plasma umano a concentrazioni dell'ordine di 1 mM e nelle urine in concentrazioni di 0-3 mM (0-0.2 ppm) (Glagau et al., 1994). Per prevenire e monitorare un eventuale eccesso di radicali liberi, è necessario conoscerne il livello presente nell'organismo.

2. Scopo della tesi

Il BPA è un composto aromatico precursore di materiali plastici e additivi chimici, ed è entrato a far parte della categoria dei contaminanti che alterano il sistema endocrino con molteplici effetti negativi sulla salute umana (azione di mimesi estrogenica, alterazioni della funzione tiroidea e dei sistemi riproduttivo, nervoso ed immunitario).

Nella fase produttiva industriale si hanno emissioni accidentali di BPA durante il trattamento e la lavorazione dei monomeri plastici. Piccole frazioni di BPA possono essere ingerite dall'uomo poiché la sostanza migra nel tempo dal contenitore alimentare al contenuto (es. bevanda in lattina o contenitore per microonde) soprattutto se esposto ad alte temperature. Anche il contatto con composti acidi o basici, la presenza di elevati livelli di cloruro di sodio o di oli vegetali, è in grado di provocare un incremento del rilascio di BPA dai materiali polimerici. Il BPA viene rilasciato dai biberon in policarbonato, che in molti Paesi sono stati ritirati dal commercio nel 2011, e da bottiglie di acqua riutilizzabili. Infine, la carta termica degli scontrini e delle fotocopie rilasciano BPA. Nell'adulto la tossicità del BPA sembra modesta, tuttavia l'esposizione nel feto e nel neonato può risultare deleteria. Al di là della tossicità, l'aspetto che al momento preoccupa maggiormente è l'effetto che il BPA ha anche a basse dosi sul metabolismo: diversi studi in tutto il mondo correlano questa sostanza all'incidenza di diabete, ipertensione, obesità e problemi cardiaci.

L'attenzione per il BPA è piuttosto recente a livello umano, mentre è assai ridotta per la salute dell'ecosistema. Tuttavia è noto che il BPA è presente anche come contaminante dei suoli, e pur essendo stato documentato il suo bioaccumulo negli organismi vegetali, non sono disponibili informazioni precedenti relativi agli effetti del BPA sugli organismi animali del suolo, in linea con il fatto che il suolo è stato una matrice ambientale molto trascurata. Il presente lavoro di tesi quindi si pone come uno studio pilota per valutare la possibile tossicità del BPA su organismi modello che vivono in questa matrice. In questo studio è stato scelto come bioindicatore "sentinella" il lombrico *Eisenia andrei*, il comune verme rosso, come suggeriscono le linee guida internazionali (OECD, OCSE).

I possibili effetti biologici del bisfenolo A nei lombrichi sono stati indagati sia attraverso endpoint del ciclo vitale (accrescimento, riproduzione e mortalità), sia attraverso una batteria di biomarker (generali e specifici).

Data la mancanza di osservazioni precedenti si è scelto un approccio integrato tra i parametri del ciclo vitale, in genere meno sensibili ma ecologicamente più rilevanti, e i biomarker, risposte più sensibili che possono rappresentare segnali precoci di allarme inerenti l'esposizione a contaminanti ambientali o l'effetto di questi ultimi sugli organismi indagati.

Al momento non esistono batterie di biomarker specifiche per questa sostanza, quindi un ulteriore scopo della ricerca è stato quello di evidenziare biomarker utili ad indagare eventuali alterazioni biochimiche e funzionali nei lombrichi in risposta all'esposizione a dosi crescenti di bisfenolo A.

Le risposte che sono state indagate sono:

- la diminuzione della stabilità delle membrane lisosomiali, che indica una riduzione dello stato di salute generale degli organismi;
- l'alterazione dell'attività degli enzimi catalasi e glutatione-S-trasferasi, indice di stress ossidativo o induzione di meccanismi di detossificazione;
- la diminuzione dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi, la quale indica neurotossicità;
- l'accumulo di lipofuscine o lipidi neutri, che è sintomo rispettivamente di stress ossidativo o alterazioni del metabolismo;
- la variazione della malondialdeide, composto intermedio della perossidazione lipidica, indica un stress ossidativo in corso.

3. Materiali e metodi

3.1 Principio dell'esperimento

L'attività sperimentale è stata svolta tra Maggio 2012 e Febbraio 2013.

E' stata valutata l'esposizione di lombrichi adulti della specie *Eisenia andrei* (Bouché 1972) al contaminante bisfenolo A (BPA) presente a diverse concentrazioni in un terreno naturale.

Il test è di tipo cronico ed è diviso in due fasi: la prima fase è consistita in 28 giorni di incubazione al termine dei quali sono stati valutati gli endpoint di accrescimento e mortalità. La seconda fase è partita dal 28° giorno, in cui gli adulti sono stati rimossi dal suolo, ed è proseguita fino al 56° giorno, quando è stata valutata la riproduzione, contando i neonati presenti nel suolo ed i bozzoli prodotti. L'utilizzo di questa specie in test cronici è regolamentato dalla norma ISO 11268-2 e dalle linee guida OECD 222, che sono state prese come modello per l'attività sperimentale. Oltre agli endpoint riguardanti accrescimento, mortalità e riproduzione, è stata utilizzata una batteria di biomarker sia generali che specifici per indagare eventuali alterazioni biochimiche e funzionali nei lombrichi in risposta all'esposizione a dosi crescenti di bisfenolo A.

3.2 Allevamento di partenza

I lombrichi della specie *Eisenia andrei* utilizzati nell'esperimento provengono da un primo ceppo di allevamento dell'Università di Alessandria, risalente a dicembre 2011.

Per poter essere impiegati nel test i lombrichi devono essere di età e taglia standard, perciò è preferibile iniziare le colture con i bozzoli. Una volta che la coltura è stabilita, viene mantenuta trasferendo i lombrichi adulti (foto 3.1) in una nuova vasca di allevamento con substrato fresco per 14-28 giorni per permettere la produzione di ulteriori bozzoli. I giovani prodotti dai bozzoli sono usati come base per una nuova coltura.



Foto 3.1: separazione degli adulti dalla terra e i bozzoli

I lombrichi nati dai bozzoli possono essere usati per i test quando hanno un'età compresa tra i 3 e i 12 mesi. Nel nostro caso i lombrichi utilizzati al momento del test avevano un'età compresa tra i 6 e i 7 mesi, in quanto erano nati da bozzoli depositi tra fine gennaio e fine febbraio 2012.

Le vasche impiegate per gli allevamenti sono di plastica, rettangolari, misurano circa 45 x 30 cm, sono chiuse da coperchio e da un foglio di plastica trasparente forato in modo da evitare la fuga dei lombrichi e allo stesso tempo permettere il ricambio di aria. All'interno della vasca è stato preparato il substrato, che è composto da 1 kg di suolo AR (suolo agricolo prelevato dal territorio del comune di Argenta, in provincia di Ferrara) più 1,250 kg di acqua distillata, ai quali è stato aggiunto 1 kg di torba; il tutto è stato miscelato in modo da ottenere una tessitura omogenea. Il suolo AR è stato campionato e caratterizzato per la prima volta all'interno del progetto "Progworm", svolto presso il corso di Laurea in Scienze Ambientali negli anni 2003-2004. Nella tabella (3.1) sono riassunte le caratteristiche principali di questo suolo dalla tessitura marcatamente argillosa. La scelta di un terreno naturale di provenienza agricola al posto del terreno sintetico che solitamente viene utilizzato nei test è ammessa dall'ultimo aggiornamento della norma ISO sui test di riproduzione dei lombrichi (ISO 11268-2:2012(E)): *"This chronic test is applicable to soils and soil materials of unknown quality, e.g. from contaminated sites, amended soils, soils after remediation, agricultural or other sites concerned, and waste materials"*.

	Profondità (cm)	pH	Conduttività (µS/cm)	Sali solubili (mg/kg)	Sabbia %	Limo %	Argilla %	Classificazione USDA	Calcare totale (g/kg)	Sostanza organica (g/kg)	CSC (meq/100g)	Loss On Ignition	Saturazione in basi %
A1	0-9	7,4	583,8	7,3	22	34	44	ARGILLOSO	37,8	32,0	20,4	20,1	22,0
A2	9-24	7,6	436,5	5,5	20	34	46	ARGILLOSO	43,5	19,4	18,7	18,6	25,1
A3	24-46+	7,7	511,5	6,4	18	36	46	ARGILLOSO	30,6	20,9	18,7	18,2	23,1

Tabella 3.1: caratteristiche chimico-fisiche del suolo AR

Il suolo AR è stato in un primo momento pulito per eliminare radici, sassi e piccoli insetti e sminuzzato manualmente in modo da ottenere frammenti sufficientemente piccoli: a questo punto il terreno è stato essiccato in stufa a 60°, poi lasciato raffreddare, e poi essiccato nuovamente in stufa a 60° per eliminare eventuali organismi presenti. Il terreno essiccato è stato poi macinato e setacciato con un mulino a cilindri DARGENT SA con maglia di 2 mm (vedi foto 3.2), e utilizzato per le vaschette del test.



Foto 3.2: mulino a cilindri DARGENT SA

Sia le vasche dell'allevamento di partenza che le vaschette dei test sono state mantenute a temperatura costante di 20±1°C e in condizioni di illuminazione di 400-800 lux, con un fotoperiodo di 16 h luce e 8 h buio (ISO 11268-2:2012).

Gli allevamenti sono stati monitorati ogni settimana smuovendo e aerando il substrato e i lombrichi sono alimentati (sempre settimanalmente) con fiocchi d'avena e crusca, inumidendo con acqua distillata il terreno fino al raggiungimento del grado di umidità ottimale.

3.3 Test di esposizione

Il suolo essiccato e macinato è stato posto in contenitori di vetro rettangolari (foto 3.3) tipo frigoverre (20 x 12 x 8 cm), in quantità di 600 g per ogni contenitore, annotando il peso del contenitore sia vuoto che pieno.



Foto 3.3: vaschetta “frigoverre” usata per il test

Per scegliere le concentrazioni di BPA più adatte è stato effettuato un test preliminare con sette concentrazioni crescenti (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 e 100 mg/Kg suolo), ciascuna in duplicato.

Oltre alle vaschette contaminate, sono state preparate le vaschette di controllo e di controllo-solvente. Il controllo, che si aggiunge in tutti i disegni sperimentali, serve per avere un paragone con il suolo non contaminato, invece il controllo solvente è stato aggiunto per poter escludere un eventuale effetto del solvente dall'analisi.

Il controllo è stato preparato aggiungendo 200 ml di acqua distillata al terreno, mentre per il controllo-solvente sono stati aggiunti 200 ml di soluzione stock di metanolo (40 ml/L), il solvente scelto per il test. Le vaschette esposte al BPA sono state preparate a partire da una soluzione stock di bisfenolo A (400 mg/l).

Le concentrazioni scelte per il test definitivo sono state ridotte da sette a quattro (3, 10, 30 e 100 mg/Kg suolo), e ciascun trattamento è stato replicato in quadruplicato. Sono state scelte 2 concentrazioni che rientrano nel range ambientale (3 e 10 mg/kg), e due concentrazioni molto elevate (30 e 100 mg/kg), in modo da simulare una dose naturale e una dose elevata. Le vaschette sono state preparate con soluzioni a concentrazioni crescenti di BPA e decrescenti di metanolo, seguendo lo schema in tabella 3.2:

Vaschetta	Conc BPA in suolo secco (mg/Kg)	Volume soluzione Stock di BPA per replica (mL)	Soluzione MetOH per replica (mL)
CTR	0,0	0	0
SOL	0,0	0	200
BPA 1	3,0	4,50	195,50
BPA 2	10,0	15,0	185,00
BPA 3	30,0	45,0	155,00
BPA 4	100,0	150,0	50,0

Tabella 3.2: preparazione delle vaschette del test

Nel test definitivo sono stati aggiunti, oltre al controllo (CTR) e al controllo-solvente (SOL), 2 controlli positivi (insetticida Clorpirifos 80 mg/Kg e cloruro di rame 150 mg/Kg). L'insetticida Clorpirifos (abbreviato in CP) e il cloruro di rame (Cu) sono stati utilizzati per ottenere i controlli positivi in quanto sostanze già testate in passato in questo suolo; è noto che alle concentrazioni usate interferiscono in maniera significativa con alcuni dei parametri studiati; l'effetto servirà per confermare la qualità dell'esperimento. Dopo l'aggiunta delle soluzioni di contaminante, i contenitori sono stati pesati e posizionati senza coperchio sotto cappa per fare evaporare l'eccesso di solvente, fino alla mattina seguente. Il giorno successivo (giorno 0 del test) i contenitori sono stati pesati nuovamente per verificare la perdita di acqua, e sono stati portati al peso umido del giorno precedente aggiungendo acqua distillata goccia a goccia. Inoltre ai contenitori è stato aggiunto l'alimento, che consisteva in 3 g di farina d'avena con aggiunta di 6 g di acqua distillata (v. foto 3.4).



Foto 3.4: vaschetta del test con alimento

Nella fase successiva sono stati aggiunti i vermi alle vaschette, con la seguente procedura: i lombrichi adulti in buona salute e sessualmente maturi (provvisi di clitello ben visibile) sono stati prelevati dalle colture di allevamento, immersi brevemente in acqua per lavare via il terreno in eccesso, e successivamente sono stati posizionati nelle vaschette seguendo un ordine casuale, fino a raggiungere un totale di 10 lombrichi per trattamento (foto 3.5). Ogni vaschetta contenente i 10 lombrichi è stata assegnata per estrazione casuale al trattamento corrispondente (es. controllo, controllo-solvente, concentrazione 1, concentrazione 2, ecc...).



Foto 3.5: assegnazione dei lombrichi alle vaschette

Alla fine di questa assegnazione, i contenitori per il test sono stati chiusi coprendoli con fogli di polietilene perforati, avvolti strettamente attorno alla vaschetta e tenuti fermi da elastici. Le vaschette sono state poste nei ripiani dell'incubatore termostatico (alle condizioni di luce e temperatura già descritte per l'allevamento di partenza) avendo cura di evitare che le repliche appartenenti ad uno stesso trattamento si trovassero vicine tra loro. Le posizioni dei contenitori sono state sistematicamente ruotate due volte alla settimana.

Ogni settimana per i successivi 28 giorni ai contenitori del test è stato aggiunto l'alimento (3g farina avena + 4-6 g dd H₂O, a seconda del grado di umidità), il terreno è stato mescolato per garantire l'aerazione e per evitare la formazione di grumi, ed è stato ripristinato il grado di umidità aggiungendo via via l'acqua che andava persa per evaporazione. Il ventottesimo giorno la prima fase del test si è conclusa: gli adulti sono stati prelevati dalle vaschette, sono stati contati per quantificare la sopravvivenza ed è stato registrato il peso totale degli individui per valutarne l'accrescimento.

Successivamente gli adulti sono stati lavati e posizionati uno ad uno in capsule Petri precedentemente preparate con carta da filtro inumidita con 2 ml di acqua distillata.

Due dei 10 lombrichi per ogni trattamento sono stati subito utilizzati per il neutral red retention assay (NRRA). Gli altri 8 sono stati lasciati nelle Petri in incubatore per una notte senza cibo, in modo da permettere lo svuotamento del canale digerente. Il giorno successivo 2 degli 8 lombrichi per ogni trattamento sono stati utilizzati per la preparazione dei chucks, e i restanti 6 congelati interi per le analisi successive.

Il suolo privato degli adulti e contenente i bozzoli prodotti è stato posto in incubazione per ulteriori 4 settimane nelle stesse condizioni dei primi 28 giorni, tranne per il fatto che è stato aggiunto l'alimento solo una volta all'inizio di questa seconda fase, che va dal 28° giorno al 56° giorno.

Ogni settimana a partire dal 28° giorno è stata aggiunta acqua, ripristinando quella che evaporava. Il 56° giorno è stata effettuata la conta dei neonati per valutare la riproduzione: ogni vaschetta è stata capovolta per trasferire il terreno contenente bozzoli e neonati in vasche di plastica più larghe, nelle quali è stata fatta una prima setacciatura manuale per contare i neonati vivi. Al termine della conta dei neonati la terra è stata posizionata su un setaccio con maglie di 2 mm, sul quale è stata fatta scorrere l'acqua corrente per separare la terra dai bozzoli (v. foto 3.6): poi si è proceduto alla conta dei bozzoli, discriminando tra bozzoli pieni (che vanno a fondo) e vuoti (che galleggiano), vedi foto 3.7. Conclusa questa fase, si è passati all'analisi dei biomarker.



Foto 3.6: setacciatura terreno; Foto 3.7: conta dei bozzoli

3.4 Batteria di biomarker

I biomarker scelti per la batteria impiegata in questa indagine, pur non essendo oggetto di normative, sono riconosciuti dalle linee guida delle organizzazioni internazionali di protezione dell'ambiente ed ampiamente utilizzati a questo scopo.

La batteria di biomarker utilizzata per i tessuti di *Eisenia andrei* prevede:

- la valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali tramite **neutral red retention assay (NRRA)** o saggio di ritenzione del rosso neutro: biomarker generico sullo stato di salute degli organismi;

due biomarker di tipo istochimico, ovvero:

- **accumulo lisosomiale di lipofuscine**: biomarker generico indice di stress ossidativo;
- **accumulo lisosomiale di lipidi neutri insaturi**: biomarker generico, indica alterazioni del metabolismo;

quattro biomarker enzimatici:

- **attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE)**: biomarker specifico dell'azione neurotossica di insetticidi organofosforici e carbammati;
- **attività dell'enzima catalasi (CAT)**: biomarker di stress ossidativo;
- **attività degli enzimi glutatione-S-transferasi (GST)**: biomarker di stress ossidativo;
- **contenuto in malondialdeide (MDA)**: biomarker di perossidazione lipidica.

3.5 Neutral Red Retention Assay (NRRA)

Il Neutral Red Retention Assay è un saggio di citotossicità in grado di misurare il danno causato da una sostanza chimica alla membrana lisosomiale basandosi sul tempo di ritenzione del colorante rosso neutro. Il saggio si basa sul principio che solamente i lisosomi in cellule sane assorbono e trattengono al loro interno questo colorante. Danni alla membrana, causati dall'impatto di agenti citotossici, diminuiscono i tempi di ritenzione del neutral red, inducendo la fuoriuscita degli enzimi contenuti all'interno dei lisosomi: una volta destabilizzati, i lisosomi si fondono assieme e formano strutture più grandi, e il colorante viene riversato nel citosol attraverso le membrane danneggiate. Il tempo di ritenzione del neutral red è quindi inversamente proporzionale all'entità del danno subito dalle membrane.

Il neutral red è un colorante cationico debole, lipofilico, amminico, che penetra attraverso le membrane cellulari liberamente, per diffusione non ionica, e viene catturato per protonizzazione dai lisosomi e accumulato al loro interno, dove si lega ai siti anionici sulla matrice lisosomiale.

Il grado di cattura di questo colorante dipende dal pH acido del lisosoma. La pompa protonica associata alla membrana lisosomiale mantiene l'ambiente acido dei lisosomi e ciò favorisce l'intrappolamento del colorante al loro interno. L'utilizzo di questo colorante permette anche di distinguere tra cellule vitali, danneggiate o morte. Dalle ricerche pubblicate, il Neutral Red Retention Assay ha mostrato come la stabilità delle membrane lisosomiali sia sensibile alle classi principali di inquinanti chimici, come ad esempio ai metalli inorganici, organometalli, pesticidi, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), PCB e molti altri composti. Metalli pesanti e sostanze inquinanti possono destabilizzare le membrane lisosomiali e provocarne la rottura in tempi piuttosto brevi, causando la morte della cellula. L'applicazione di questo saggio a *Eisenia andrei* prevede che gli organismi siano sottoposti a un'esposizione in vivo al suolo contaminato, e che da tali organismi vivi siano estratti i celomociti, le cellule maggiormente ricche di lisosomi, su cui poter effettuare di seguito l'analisi al microscopio per stimare gli eventuali effetti destabilizzanti sulle membrane lisosomiali.

3.5.1 Estrazione dei celomociti

Per ogni trattamento sono stati utilizzati due lombrichi che sono stati innanzitutto massaggiati nella zona terminale del corpo con una soluzione di NaCl 0,01 M, per fare fuoriuscire il contenuto dell'intestino, poi sono stati asciugati e posizionati due a due in una falcon da 15 ml, ed incubati in 4 ml di mezzo di estrusione salino a 4°C per 3 minuti. Alla sospensione di cellule sono stati aggiunti 2 ml di soluzione Hanks senza calcio (HBSS) per mantenere in vita i celomociti. In seguito le Falcon sono state centrifugate una prima volta a 910 rpm per 2 minuti a 4°C (centrifuga ALC Multispeed Refrigerated Centrifuge, PK 121R) per separare il pellet dal surnatante; quest'ultimo è stato centrifugato una seconda volta a 910 rpm per 10 minuti a 4°C per ottenere una miscela ricca di celomociti. Infine il surnatante è stato eliminato quasi del tutto, lasciando nella Falcon circa 1,5 mL di soluzione finale, è stata risospesa e utilizzata per la preparazione dei vetrini.

3.5.2 Preparazione e lettura dei vetrini

I vetrini sono stati preparati stendendovi in modo uniforme 3 µL di polilisina che permette l'adesione delle cellule sul vetrino e lasciandoli asciugare per 10-15 minuti.

Nel frattempo il colorante Neutral Red è stato preparato a partire da una soluzione madre concentrata.

Soluzione madre di Rosso Neutro: sono stati sciolti 20 mg di polvere di Neutral Red in 1 ml di DMSO in una eppendorf. Questa soluzione è stata mantenuta in frigorifero al buio (in quanto è un colorante fotosensibile) per circa tre settimane.

Soluzione di lavoro di Rosso Neutro: in una eppendorf sono stati aggiunti aggiungono 10 µl di soluzione madre di Neutral Red a 990 µl di soluzione HBSS con CaCl₂ (1,26 mM). Questa soluzione è stata preparata fresca prima di ogni analisi e mantenuta in ghiaccio e al buio fino al momento dell'utilizzo poichè si conserva per più di una giornata.

Su ogni vetrino sono stati aggiunti, in corrispondenza dello strato di polilisina, 40 µL di sospensione di celomociti, lasciati aderire in camera umida a 20° C e al buio per 15 minuti. Al termine dei 15 minuti sono stati eliminati i celomociti non adesi inclinando il vetrino, poi sono stati aggiunti 40 µL di soluzione di lavoro di rosso neutro su ogni goccia di celomociti, lasciando le cellule in incubazione all'interno della camera umida a 20°C

per 5 minuti.

E' stato poi eliminato il colorante in eccesso, posto un vetrino coprioggetto, e si è passati al microscopio a fluorescenza (Zeiss, Axiovert 100) con un ingrandimento 40x per fotografare il vetrino al tempo zero (T0) e dopo sessanta minuti (T60). Per ogni vetrino sono state scattate almeno 10 foto sia al tempo zero che al tempo sessanta. Nell'attesa tra le due osservazioni i vetrini sono stati lasciati all'interno della camera umida e buia perché il colorante è fotosensibile.

3.5.3 Analisi di immagine

Una volta salvate le fotografie sul computer in formato tiff, le immagini sono state analizzate utilizzando il software SCION IMAGE (versione Beta 4.0.3).

L'analisi di immagine consiste nel selezionare su ogni fotografia a colori l'area colorata in rosso, in cui sono presenti i celomociti, e misurare il numero di pixel all'interno di quell'area: i pixel saranno proporzionali alla quantità di colorante trattenuto nei lisosomi. Avendo il dato sia al tempo zero che dopo sessanta minuti, si riesce a dedurre quanto tempo impiegano le cellule a rilasciare il colorante nel citosol. In un primo momento con il comando Special-density slice (D) è stata impostata la palette ottimale per evidenziare la fluorescenza. Per ogni immagine sono stati ottenuti due valori: i pixel totali (ottenuti dalla foto in bianco e nero), e i pixel rossi (ottenuti dall'immagine a colori fluorescente). Di questi due valori è stato fatto il rapporto: più il rapporto si avvicina a uno e più la cellula è fluorescente, cioè trattiene più colorante, il che è di norma il comportamento di una cellula in assenza di stress. Per ogni vetrino è stata fatta la media sia dei pixel fluorescenti che dei pixel in bianco e nero. Infine i rapporti tra pixel sono stati normalizzati considerando come 100% il valore medio dei controlli.

3.6 Biomarker istochimici

3.6.1 Preparazione dei chucks

Gli 8 lombrichi rimanenti da ogni vaschetta dopo il saggio del rosso neutro sono stati prelevati dopo un giorno di “spurgo” all’interno dell’incubatore: due di questi sono stati utilizzati per la preparazione dei chucks, mentre i 6 rimanenti sono stati congelati immergendoli in azoto liquido e stoccati a -80°C fino al momento dell’analisi. I chucks sono stati preparati inizialmente posizionandovi due vermi appartenenti allo stesso trattamento, tagliati in quattro segmenti ciascuno.

Questi segmenti sono stati posizionati prima orizzontalmente su un supporto di alluminio e fatti congelare in esano (raffreddato a -70°C con azoto liquido) immergendoli per circa trenta secondi, e lasciati per almeno 24 ore in freezer a -80°C .

Il giorno successivo i segmenti di verme sono stati posizionati verticalmente sui chuck all’interno del criostato a -30°C , e ricoperti mediante inclusione in resina (Richard Allan Scientific). Per ogni chuck sono stati utilizzati 4 frammenti di lombrico verticali, uno per ogni replica (A,B,C,D) in modo da avere in ogni vetrino quattro sezioni (dalla A alla D) per ogni trattamento.

3.6.2 Accumulo di lipofuscine nei lisosomi

L’analisi dell’accumulo di lipofuscine permette di evidenziarne la presenza all’interno dei lisosomi attraverso una colorazione verde-blu. I chucks preparati in precedenza e conservati a -80°C sono stati utilizzati per ottenere al criostato sezioni di verme dello spessore di $10\ \mu\text{m}$. Le sezioni sono state trasferite sui vetrini, introdotte in Hellendal e fissate in Ca-Formolo per 15 minuti a 4°C . Successivamente sono state risciacquate con acqua distillata, colorate di verde-blu con una soluzione (3:1, 45 ml FeCl_3 1% + 15 ml $\text{Fe}(\text{KCN})_6$ 1%) lasciandole in incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente. Trascorsi i 5 minuti è stata eliminata la soluzione colorante e i vetrini sono stati immersi in acido acetico 1% per 1 minuto per fissare il colorante. Infine i vetrini sono stati risciacquati più volte con acqua distillata, lasciati asciugare all’aria per qualche ora e fissati con gel di glicerina e un vetrino coprioggetto.

3.6.2.1 Analisi d'immagine

I vetrini sono stati fotografati con fotocamera Axiocam e software MRGrab al microscopio ottico (Axioskop 40 Zeiss con ingrandimento 40x) e analizzati mediante lo stesso programma di analisi d'immagine utilizzato per il saggio del rosso neutro, Scion Image, per calcolare la densità ottica (espressa in area di pixel) di colorante legato alle lipofuscine presenti all'interno dei lisosomi e valutare quindi l'accumulo di tali residui. Sono stati fotografati due vetrini per trattamento, e per ogni vetrino sono state scattate 5 fotografie (nella zona del tessuto cloragogeno) per ogni sezione (per un totale di venti foto a vetrino, e quaranta foto per trattamento). In questo modo si è cercato di avere per ogni vetrino fotografie il più possibile rappresentative di tutte le quattro sezioni di verme in esso fissate.

3.6.3 Accumulo di lipidi neutri insaturi nei lisosomi

La tecnica di valutazione dell'accumulo di lipidi neutri insaturi permette di evidenziare la presenza di questi derivati lipidici all'interno dei lisosomi attraverso una colorazione citosolica tramite il colorante oil red.

Sono stati prelevati dal congelatore a -80°C i chunks dei controlli e dei trattati, e posizionati all'interno del criostato. Poi sono state preparate le sezioni di verme dello spessore di $10\ \mu\text{m}$, trasferite sui vetrini, introdotte in Hellendal e fissate in Ca-Formolo per 15 minuti a 4°C , risciacquate con acqua distillata e immerse in trietilfosfato 60% per 3 minuti a temperatura ambiente. Successivamente le sezioni sono state colorate di rosso con la soluzione di colorante Oil Red 0.1% per 15 minuti, al buio (poiché è un colorante fotosensibile) e a temperatura ambiente. Al termine dei 15 minuti sono state nuovamente lavate in trietilfosfato per 30", risciacquate più volte con acqua distillata e infine lasciate asciugare all'aria per almeno due ore prima di essere fissate con gel di glicerina e vetrino coprioggetto.

3.6.3.1 Analisi di immagine

I vetrini sono stati fotografati al microscopio ottico ad un ingrandimento 40x (lo stesso utilizzato per l'analisi delle lipofuscine) e analizzati mediante Scion Image, per calcolare la densità ottica (espressa in area di pixel) di colorante legato ai lipidi neutri presenti all'interno dei lisosomi e valutare quindi l'accumulo di tali residui. Anche in questo caso sono stati fotografati due vetrini per trattamento, e per ogni vetrino sono state scattate 5 fotografie ogni sezione (per un totale di venti foto a vetrino, e quaranta foto per trattamento), in modo da avere per ogni vetrino delle fotografie il più possibile rappresentative di tutte le quattro sezioni di verme in esso fissate.

3.7 Biomarker Enzimatici

3.7.1 Preparazione degli omogenati

I vermi interi congelati in precedenza sono stati utilizzati per la batteria di biomarker enzimatici. Il primo passo per effettuare questo tipo di analisi è omogeneizzare il tessuto degli organismi, partendo dai lombrichi conservati a -80°C .

Gli omogenati per CAT e GST sono stati preparati seguendo la seguente procedura: è stato preparato il tampone fosfato con cui sono stati omogeneizzati i tessuti: tampone potassio-fosfato (KPB, 50 mM) a pH 7.0 contenente Na_2EDTA (0.5 mM). È stato prelevato dal congelatore un lombrico per ogni trattamento e controllo. Sono stati aggiunti quattro volumi di KPB per ogni volume di tessuto. Infine è stato aggiunto $1\ \mu\text{l}$ di cocktail di inibitori delle proteasi per ogni 100 mg di tessuto. Gli omogenati per il saggio dell'AChE e della MDA invece sono stati preparati con tampone KPB a pH 7.4 (due volumi di tampone per ogni volume di tessuto) e senza l'aggiunta di inibitori delle proteasi. Il tutto è stato poi omogeneizzato tramite ultra turrax (IKA) (v. foto 3.8) e trasferito all'interno di una o più eppendorf.



Foto 3.8: omogeneizzazione con ultra turrax

Dopo aver centrifugato l'omogenato a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C (centrifuga ALC Multispeed Refrigerated Centrifuge, PK 121R), è stato prelevato il sovrinatante: 50 µL di sovrinatante sono stati diluiti in 200 µL di NaOH 1N e sono stati conservati per il dosaggio delle proteine, mentre il resto dell'omogenato è stato aliquotato all'interno di nuove eppendorf e mantenuto in congelatore a -80°C per effettuare i test successivi.

3.7.2 Dosaggio delle proteine

Il dosaggio delle proteine è stato effettuato tramite il saggio di Lowry (1951). Il saggio viene effettuato tramite un lettore di micropiastre (Bioteck EL 808).

In seguito alla preparazione degli omogenati per la valutazione dell'attività enzimatica, 50 µL di sovrinatante sono stati prelevati e diluiti 1:5 in NaOH 1N.

Per il saggio i campioni sono stati diluiti 1:1 con acqua distillata. Si è proceduto preparando cinque standard di albumina, un mix per il bianco e gli standard, e i campioni opportunamente diluiti e replicati in triplicato.

I 5 standard a concentrazioni crescenti di albumina, che servono a costruire la curva a concentrazione nota di proteine, sono stati ottenuti a partire da una concentrazione madre di albumina (0,5 mg/ml), secondo lo schema seguente:

S1: 1 µL in 300 µL dd H₂O

S2: 2,5 µL in 200 µL dd H₂O

S3: 5 µL in 200 µL dd H₂O

S4: 7,5 µL in 50 µL dd H₂O

S5: 10 µL in 300 µL dd H₂O

Caricamento della micropiastre:

E' stato preparato un mix per gli standard e il bianco contenente 1,5 ml di dd H₂O e 300 µL NaOH. Da questo mix sono stati prelevati 60 µL, posizionati in ognuno dei pozzetti destinati al bianco e agli standard. Nei pozzetti destinati al bianco, oltre ai 60 µL di mix sono stati aggiunti 40 µL di dd H₂O dd, mentre nei pozzetti degli standard sono stati

aggiunti 40 μL di standard corrispondente, dal primo al quinto.

I pozzetti dei campioni invece contenevano 100 μL di mix di ogni campione: il mix del campione è stato preparato in precedenza in quadruplicato (50 μL di omogenato + 450 μL di dd H_2O).

A questo punto è stata preparata la soluzione A+B in proporzione 100:1 (22 ml di soluzione A e 220 μL di soluzione B).

La soluzione A-B è stata aggiunta a tutti i pozzetti (200 μL /pozzetto): una volta finita di caricare questa soluzione si lascia il tutto in incubazione per 10 minuti. Dopo questa fase è stata preparata la soluzione C composta per il 50% dal reattivo di Folin e per il 50% da acqua distillata (2 ml Folin e 2 ml di dd H_2O). La soluzione C è stata aggiunta in tutti i pozzetti (20 μL /pozzetto), poi è stato lasciato il tutto in incubazione 30 minuti al buio, infine è stata fatta una lettura dell'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 650 nm, grazie alla quale è stato possibile effettuare il dosaggio delle proteine per ogni saggio enzimatico successivo. Il software utilizzato nella lettura è GEN5.

3.7.3 Attività dell'enzima acetilcolinesterasi (AChE)

L'attività dell'enzima acetilcolinesterasi è stata valutata con il metodo di Ellman (1961), che utilizza acetiltiocolina come substrato. Il test quantifica la velocità di idrolisi del substrato specifico (acetiltiocolina, ASCh) da parte dell'enzima acetilcolinesterasi in acetato e tiocolina, la quale reagendo con un colorante (DTNB, acido 5,5' ditio-bis(2)nitrobenzoico) sviluppa una reazione colorimetrica con un massimo di assorbanza del prodotto di reazione a 405 nm di lunghezza d'onda.

Questo test è stato effettuato tramite lo stesso lettore di micropiastre utilizzato per il dosaggio delle proteine (Bioteck EL 808).

Per la reazione è stato impiegato il tampone potassio-fosfato (KPB, 50 mM) a pH 7,4 utilizzando NaOH 1N contenente Na_2EDTA (0.5 mM). Una volta preparato, il tampone fosfato è stato portato a 30° C a bagnomaria. Successivamente è stata preparata la soluzione colorante sciogliendo un quantitativo di colorante DTNB ad una parte del tampone in modo che abbia una concentrazione di 3,17 mg/ml.

Sono state scongelate le aliquote di omogenato dei campioni. Gli standard di acetilcolinesterasi sono stati preparati a partire da una soluzione madre M1 contenente

AChE standard (0,5 mM) seguendo lo schema seguente:

M1: 5 μ L di AChE St. + 95 μ L dd H₂O

M2: 100 μ L (M1) + 275 μ L dd H₂O

5: 200 μ L (M2) + 200 μ L di dd H₂O = S5

2,5: 200 μ L (5) + 200 μ L dd H₂O = S4

1: 100 μ L (M2) + 900 μ L dd H₂O = S3

0,5: 100 μ L (5) + 900 μ L dd H₂O = S2

Il substrato (ASCh) per l'analisi è stato preparato sciogliendo un'aliquota di acetiltiocolina standard (4,34 mg/ml) in dd H₂O.

Caricamento della micropiastra:

Una volta preparati gli standard è stata caricata la micropiastra: il mix per i bianchi e gli standard costituito da 8025 μ L tampone + 375 μ L DTNB (colorante) è stato posizionato in tutti i pozzetti dedicati al bianco e agli standard (280 μ L mix/ pozzetto).

Nei pozzetti del bianco sono stati aggiunti 20 μ L di dd H₂O/ pozzetto, per lo standard S1 si sono aggiunti 10 μ L dd H₂O/ pozzetto, mentre per gli standard S2, S3, S4, S5 la quantità da aggiungere era di 10 μ L standard/ pozzetto.

Per quanto riguarda i campioni, per prima cosa è stato preparato il mix quintuplicato di ogni campione, che viene aggiunto in quantità di 290 μ L/ pozzetto. Successivamente sono stati aggiunti con una multipipetta 10 μ L/ pozzetto di substrato ASCh in tutti i pozzetti eccetto il bianco, ed è stata fatta partire la lettura.

Il software utilizzato nella lettura è GEN5: l'analisi ha una durata di dieci minuti e lo strumento legge a 405 nm a intervalli di un minuto. I risultati finali sono stati espressi in nmol/min/mg di proteina.

3.7.4 Attività dell'enzima Catalasi (CAT)

Il saggio della catalasi verifica l'attività di questo enzima, che converte il perossido di idrogeno in acqua e ossigeno all'interno della cellula. Il test viene effettuato tramite uno spettrofotometro (Beckman Coulter, DU 800 spectrophotometer), ad una temperatura costante di 25°C. L'attività enzimatica viene valutata attraverso la diminuzione dell'assorbanza a 240 nm (con coefficiente di estinzione molare di 0.0394 cm²/μmol), dovuta al consumo di H₂O₂ da parte dell'enzima.

E' stato preparato il tampone fosfato (KPB, 50 mM) a pH 7,0 utilizzando NaOH 1N contenente Na₂EDTA (0.5 mM). Per effettuare questo saggio è stato preparato il substrato per l'enzima, che consiste in una soluzione 55 mM di H₂O₂ in KPB.

Nel frattempo lo spettrofotometro è stato tarato con il bianco (3 ml dd H₂O). Successivamente è stata effettuata un'altra taratura, con il bianco di riferimento per l'analisi (costituito da 3 ml di tampone KPB al quale è stato aggiunto il perossido di idrogeno).

Per quanto riguarda l'attività dei campioni, in ogni cuvetta sono stati messi 2,98 ml di substrato e 20 μL di omogenato, per ottenere un volume finale di 3 ml; dopo aver mescolato velocemente invertendo le cuvette per 2-3 volte, si è proceduto con la lettura.

I campioni sono stati analizzati in triplicato. La lettura è stata impostata a 240 nm, nello spettro degli UV, perciò le cuvette sono di quarzo.

La reazione è stata seguita per 2 minuti; il programma permette di leggere i valori di assorbanza ogni 16.8 secondi e permette di costruire una curva dell'attività dell'enzima presente all'interno del campione e di calcolarne la retta che meglio interpola i dati, fornendo anche il valore del suo coefficiente angolare, che ha valore negativo, in quanto viene registrato un consumo di substrato e la sua conseguente diminuzione. L'attività finale è stata espressa come attività specifica, ossia come unità enzimatiche (U) per mg di proteine.

3.7.5 Attività dell'enzima Glutatione-S-Transferasi (GST)

L'enzima GST è naturalmente presente all'interno delle cellule e quindi già presente nell'omogenato: questo enzima coniuga il glutatione ridotto (GSH) con il CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzene), che vengono aggiunti ai campioni durante il saggio. Questo test viene effettuato tramite il lettore di micropiastre (Bioteck EL 808). L'attività enzimatica viene calcolata in base all'aumento dell'assorbanza a 340 nm, dovuta alla coniugazione del substrato da parte dell'enzima.

E' stata preparata la soluzione madre di CDNB 0,3 M sciogliendo 60,8 mg di CDNB in 1 ml di etanolo, da cui sono stati prelevati 166,6 μ L, aggiunti a 50 μ L di soluzione tampone KPB (pH 7,0) portata precedentemente a 30°C a bagnomaria. In questo modo è stata ottenuta la miscela di reazione, che ha una concentrazione finale di CDNB 1,1 mM.

Il glutatione (GSH) è stato preparato sciogliendo 67,6 mg in 2 ml di dd H₂O: il tutto è stato tenuto in ghiaccio (4°C) per tutta la durata del saggio.

Gli omogenati erano molto ricchi di proteine, perciò per ottenere un andamento lineare è stato necessario diluirli 1:1 in tampone potassio-fosfato (KPB).

Caricamento della micropiastre:

In ogni pozzetto sono stati posizionati 200 μ L di miscela di reazione, 10 μ L di GSH e 10 μ L di campione (omogenato).

I pozzetti del bianco contenevano la miscela di reazione (200 μ L/pozzetto), il GSH (10 μ L), ma non il campione, e al suo posto sono stati messi 10 μ L di tampone KPB.

Il GSH è stato aggiunto all'ultimo prima di eseguire l'analisi di assorbanza perché fa partire immediatamente la reazione.

Il software utilizzato nella lettura dell'assorbanza è GEN5: la procedura prevede una lettura di assorbanza a 340 nanometri al minuto per otto minuti.

Il risultato finale è stato espresso come attività specifica, ossia come milli-unità enzimatiche (mU) per mg di proteine.

3.7.6 Malondialdeide (MDA)

Questo saggio consente di determinare il quantitativo di malondialdeide nei campioni omogenati: il metodo si basa sulla variazione dell'assorbanza, dopo incubazione a 45°C, della soluzione di 1-metil-2-fenilindolo (NMPI) in acetonitrile quando 2 molecole di NMPI si legano a 1 molecola di MDA generando una carbocianina stabile.

Partendo dagli omogenati di verme diluiti 1:2 con tampone di lisi (20 mM Tris-HCl, pH 7.4 contenente 100 µL di β-mercaptoetanolo per ogni 100 ml di tampone), sono stati aggiunti alle eppendorf prima un reattivo R1 e poi un secondo reattivo R2 per far partire la reazione.

Il reattivo R1 (10,3 mM NMPI) è stato preparato sciogliendo 0,064 g di NMPI in 30 ml di acetonitrile (conservando il tutto a 4°C). Prima dell'uso sono stati aggiunti 10 ml di metanolo (rapporto MetOH:NMPI=1:3). Per ogni eppendorf sono stati aggiunti 195,2 µL di reattivo R1.

Il reattivo R2 è acido cloridrico concentrato (HCl 37% circa 10.1N). Per ogni eppendorf sono stati aggiunti 100 µL di reattivo R2 sotto cappa chimica.

Lo standard 2 (S2) è stato preparato aggiungendo 16,5 µL di TMOP 10mM (1,1,3,3-tetrametossipropano) in 10 ml di Tris-HCl 20 mM a pH 7,4 (tampone con cui sono stati omogenati i tessuti, senza il β-mercaptoetanolo), poi diluendo 1:100 in H₂O, e infine conservando il tutto in ghiaccio a 4°C.

Gli standard sono 6 (A, B, C, D, E, F) e sono stati costruiti con una quantità comune di reagente R1 e R2 più sei concentrazioni crescenti di standard S2 e decrescenti di acqua deionizzata, secondo il seguente schema:

A: 195,2 µL R1 + 58,6 µL dd H₂O + 1,5 µL S2 + 100 µL R2

B: 195,2 µL R1 + 57 µL dd H₂O + 3 µL S2 + 100 µL R2

C: 195,2 µL R1 + 52,6 µL dd H₂O + 7,5 µL S2 + 100 µL R2

D: 195,2 µL R1 + 45 µL dd H₂O + 15 µL S2 + 100 µL R2

E: 195,2 µL R1 + 30 µL dd H₂O + 30 µL S2 + 100 µL R2

F: 195,2 µL R1 + 0 µL dd H₂O + 60 µL S2 + 100 µL R2

Il bianco conteneva solo R1 (195,2 µL) e acqua distillata (60 µL).

Le eppendorf (campioni, bianco e standard) sono state incubate per 40 minuti a 45°C in

un bagnetto termostatico con lenta agitazione. Al termine dei 40 minuti sono state centrifugate a 13200 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante è stato trasferito direttamente sulla micropiastra.

La micropiastra è stata posizionata nel lettore (Bioteck EL 808) che ha misurato l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 570 nm con una lettura immediata. Per calcolare la quantità di MDA (μM) presente nel campione è stato necessario costruire la curva degli standard ed estrapolare l'equazione della retta, quindi interpolare i dati delle assorbanze dei campioni con l'equazione della retta standard.

Il risultato finale è stato espresso in nanomoli (nmol) per mg di proteine.

3.8 Analisi statistica dei dati

Per verificare la significatività dei risultati riguardanti i parametri del ciclo vitale (accrescimento, riproduzione e sopravvivenza) e quelli riguardanti i biomarker, i dati finali sono stati valutati con il test di analisi della varianza (ANOVA), utilizzando il software “Statistica” (versione 6.0). Questa analisi permette di stabilire se le differenze tra le medie di due o più serie di dati differiscono in modo significativo, ed è basata sulla scomposizione della variabilità totale in due componenti: quella dovuta alle differenze tra trattamenti, e quella residua dovuta alle differenze entro i trattamenti. La verifica di omogeneità della varianza, condizione necessaria per applicare l'analisi, è stata eseguita attraverso il test di Cochran. Nel caso l'ANOVA risultasse significativa, per il confronto tra i singoli trattamenti sono stati effettuati due test: il test di Dunnett, che individua quali sono i trattamenti significativamente diversi dal controllo, e poi il test di Newman-Keuls che confronta tutti i trattamenti tra loro. In questo modo è stato individuato il trattamento (o i trattamenti) che più si discostavano dagli altri.

4. Risultati e Discussione

I risultati sia dei parametri del ciclo vitale che dei biomarker sono espressi in funzione dei trattamenti: controllo (CTR), solvente (SOL), cloruro di rame (Cu), clorpirifos (CP), e BPA a 4 concentrazioni (BPA 1,2,3,4) rispettivamente di 3, 10, 30 e 100 mg/Kg suolo.

4.1 Parametri del ciclo vitale

4.1.1 Mortalità

La mortalità in questo test è stata quasi nulla, poiché dopo 28 giorni di esposizione c'è stato un unico organismo non sopravvissuto, appartenente al trattamento del clorpirifos, uno dei controlli positivi inseriti come paragone con la sostanza indagata. Gli organismi appartenenti a questo trattamento hanno subito un cambiamento di comportamento evidente, poiché già dai primi giorni di esposizione presentavano una ridotta mobilità e un colore del corpo scuro, accompagnato da una evidente perdita di peso e di umidità corporea. Per quanto riguarda gli altri trattamenti non sono stati riscontrati comportamenti particolari durante la durata del test. Grazie alla elevata sopravvivenza è stato possibile avere organismi a sufficienza per eseguire tutti i biomarker in programma.

4.1.2 Accrescimento

La risposta all'accrescimento è stata valutata annotando il peso totale per trattamento dei lombrichi prima e dopo l'esposizione di 28 giorni. Le figure 4.1 e 4.2 mostrano rispettivamente il peso totale per trattamento al giorno zero e al giorno 28.

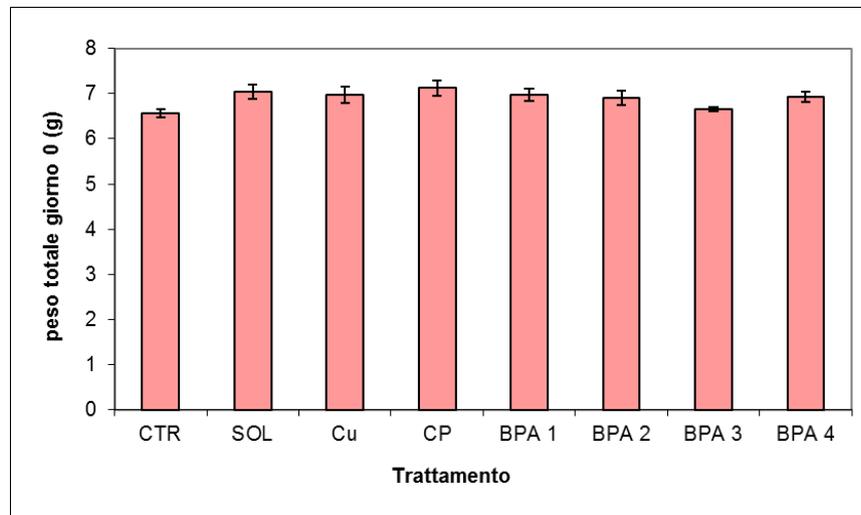


Figura 4.1: peso totale dei lombrichi al giorno zero espresso in grammi. Sono riportate le medie dei diversi trattamenti \pm l'errore standard.

Per quanto riguarda il peso totale dei lombrichi al giorno zero l'ANOVA riportata in tabella 4.1 è risultata non significativa.

Tabella 4.1: Tavola di Anova del peso totale dei lombrichi al giorno zero.

Tavola di ANOVA					
Sorgente di variaz.	SS	df	MS	F	p
trattamento	1,009	7	0,144	1,950	0,105
residua	1,770	24	0,074		

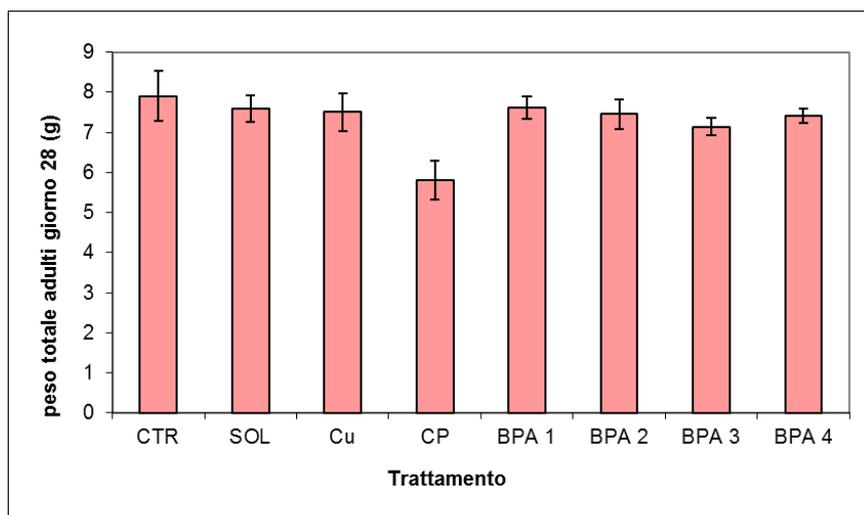


Figura 4.2: peso totale dei lombrichi al giorno ventotto espresso in grammi. Sono riportate le medie dei diversi trattamenti \pm l'errore standard.

Si può notare dalla figura 4.2 che al giorno 28 in tutti i trattamenti c'è stato un aumento del peso totale, tranne nel trattamento del clorpirifos nel quale c'è stata una diminuzione.

Tabella 4.2: Tavola di ANOVA e Test di Newman-Keuls relativi al peso totale dei lombrichi al giorno 28.

Tavola di ANOVA

Sorgente di variaz.	SS	df	MS	F	p
trattamento	11,670	7	1,667	2,654	0,035
residua	15,078	24	0,628		

Test di Newman-Keuls

Trattamento	CTR	SOL	CU	CP	BPA 1	BPA 2	BPA 3	BPA 4
controllo	CTR	0,850	0,889	0,018	0,619	0,926	0,817	0,945
controllo solvente	SOL	0,850	0,863	0,038	0,968	0,963	0,923	0,985
rame 150 mg/kg	CU	0,889	0,863	0,041	0,975	0,930	0,917	0,984
chlorpyrifos 80 mg/kg	CP	0,018	0,038	0,041	0,045	0,033	0,025	0,022
bisfenolo A 3 mg/kg	BPA 1	0,619	0,968	0,975	0,045	0,990	0,953	0,995
bisfenolo A 10 mg/kg	BPA 2	0,926	0,963	0,930	0,033	0,990	0,846	0,933
bisfenolo A 30 mg/kg	BPA 3	0,817	0,923	0,917	0,025	0,953	0,846	0,644
bisfenolo A 100 mg/kg	BPA 4	0,945	0,985	0,984	0,022	0,995	0,933	0,644

L'ANOVA in questo caso è significativa, perciò è stato effettuato il test di Dunnet che ha indicato come trattamento significativo il CP. Il test di Newman-Keuls (in tabella 4.2) ha confermato il CP come unico trattamento significativo.

La figura 4.3 riporta il grafico dell'accrescimento corporeo valutato come percentuale del peso medio al giorno 28 rispetto al peso medio del giorno 0.

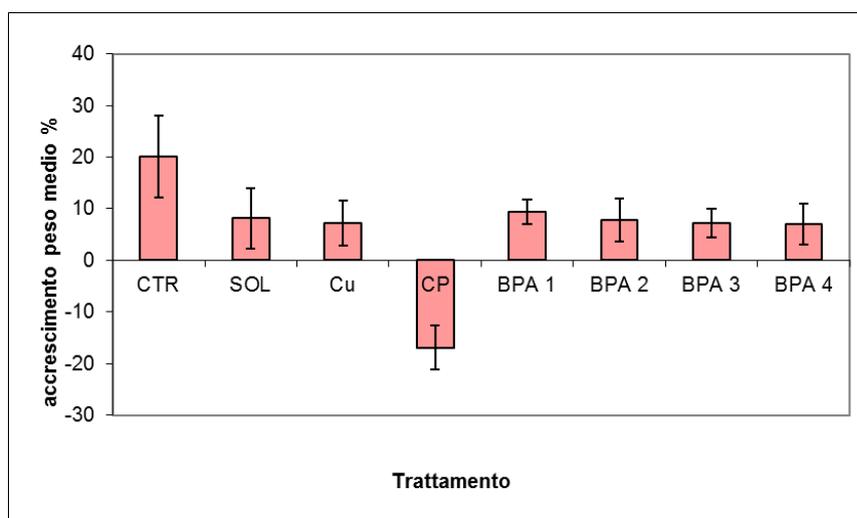


Figura 4.3: accrescimento corporeo espresso come percentuale del peso medio al giorno 28 rispetto al peso medio del giorno 0. Sono riportate le medie dei diversi trattamenti \pm l'errore standard.

Tabella 4.3: Tavola di ANOVA e Test di Newman-Keuls per la valutazione della percentuale di accrescimento corporeo medio.

Tavola di ANOVA

Sorgente di variaz.	SS	df	MS	F	p
trattamento	2990,856	7	427,265	4,703	0,002
residua	2180,199	24	90,842		

Test di Newman-Keuls

Trattamento	CTR	SOL	CU	CP	BPA 1	BPA 2	BPA 3	BPA 4
controllo	CTR	0,202	0,344	0,000	0,125	0,290	0,424	0,472
controllo solvente	SOL	0,202	0,990	0,012	0,861	0,962	0,999	1,000
rame 150 mg/kg	CU	0,344	0,990	0,008	0,989	0,933	0,997	0,999
chlorpyrifos 80 mg/kg	CP	0,000	0,012	0,008	0,010	0,010	0,004	0,002
bisfenolo A 3 mg/kg	BPA 1	0,125	0,861	0,989	0,010	0,973	0,998	0,999
bisfenolo A 10 mg/kg	BPA 2	0,290	0,962	0,933	0,010	0,973	0,996	0,999
bisfenolo A 30 mg/kg	BPA 3	0,424	0,999	0,997	0,004	0,998	0,996	0,968
bisfenolo A 100 mg/kg	BPA 4	0,472	1,000	0,999	0,002	0,999	0,999	0,968

Dal momento che l'ANOVA in tabella 4.3 ha indicato come significative le differenze tra i trattamenti, sono stati effettuati prima il Test di Dunnett, che ha segnalato come significativo il trattamento CP, e poi il Test di Newman-Keuls, che ha confermato differenze significative per quanto riguarda il Clorpirifos confrontato agli altri trattamenti. Per il Clorpirifos si nota la diminuzione di peso, mentre per i trattamenti del BPA c'è stato un accrescimento di peso uniforme e non si notano differenze sostanziali tra le varie concentrazioni. Per quanto riguarda il solvente, confrontandolo con la colonna del controllo pare che ci sia un lieve effetto, ma non è statisticamente significativo.

Nel complesso non emergono particolari trend per quanto riguarda i trattamenti esposti alle concentrazioni di BPA testate, quindi si può concludere che non ci sono stati effetti sull'accrescimento.

4.1.3 Riproduzione

La riproduzione dei lombrichi è stata analizzata contando sia il numero di bozzoli deposti al termine della fase di esposizione, sia il numero di lombrichi neonati. La figura 4.4 riporta la media di bozzoli totali (sia vuoti che pieni) deposti al termine dei 56 giorni per ogni trattamento.

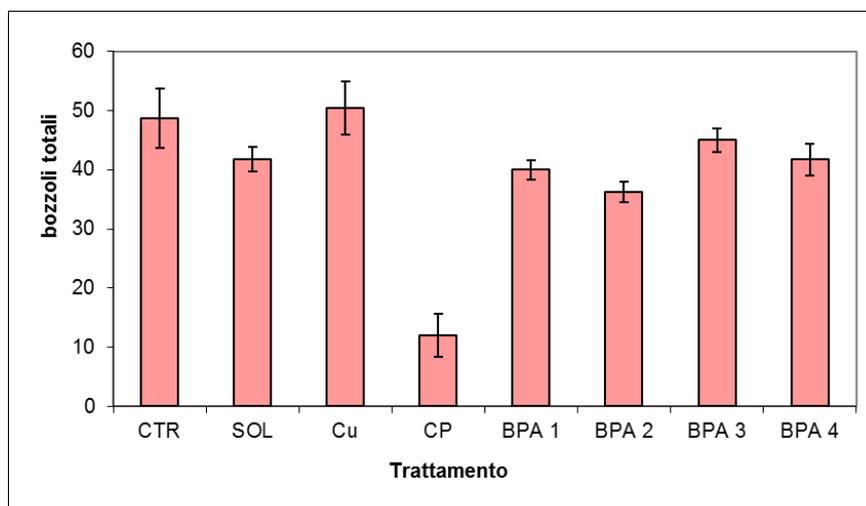


Figura 4.4: bozzoli totali deposti al termine dei 56 giorni di esposizione. Per ogni trattamento è riportata la media dei valori tra le quattro repliche \pm il rispettivo errore standard.

Tabella 4.4: Tavola di ANOVA e Test di Newman-Keuls inerente la valutazione dei bozzoli totali.

Tavola di ANOVA

Sorgente di variaz.	SS	df	MS	F	p
trattamento	4056,000	7	579,430	14,669	0,000
residua	948,000	24	39,500		

Test di Newman-Keuls

Trattamento	CTR	SOL	CU	CP	BPA 1	BPA 2	BPA 3	BPA 4
controllo	CTR	0,276	0,697	0,000	0,311	0,090	0,407	0,411
controllo solvente	SOL	0,276	0,228	0,000	0,918	0,610	0,472	1,000
rame 150 mg/kg	CU	0,697	0,228	0,000	0,209	0,051	0,443	0,311
chlorpyrifos 80 mg/kg	CP	0,000						
bisfenolo A 3 mg/kg	BPA 1	0,311	0,918	0,209	0,000	0,407	0,678	0,697
bisfenolo A 10 mg/kg	BPA 2	0,090	0,610	0,051	0,000	0,407	0,311	0,443
bisfenolo A 30 mg/kg	BPA 3	0,407	0,472	0,443	0,000	0,678	0,311	0,748
bisfenolo A 100 mg/kg	BPA 4	0,411	1,000	0,311	0,000	0,697	0,443	0,748

Anche in questo caso l'ANOVA (tabella 4.4) è stata significativa: il Test di Dunnett e di Newman-Keuls hanno evidenziato che il trattamento del Clorpirifos è quello che si è discostato maggiormente dal controllo e dagli altri trattamenti.

L'istogramma in figura 4.5 mostra le percentuali di schiusa dei bozzoli per ogni trattamento al termine dei 56 giorni di esposizione.

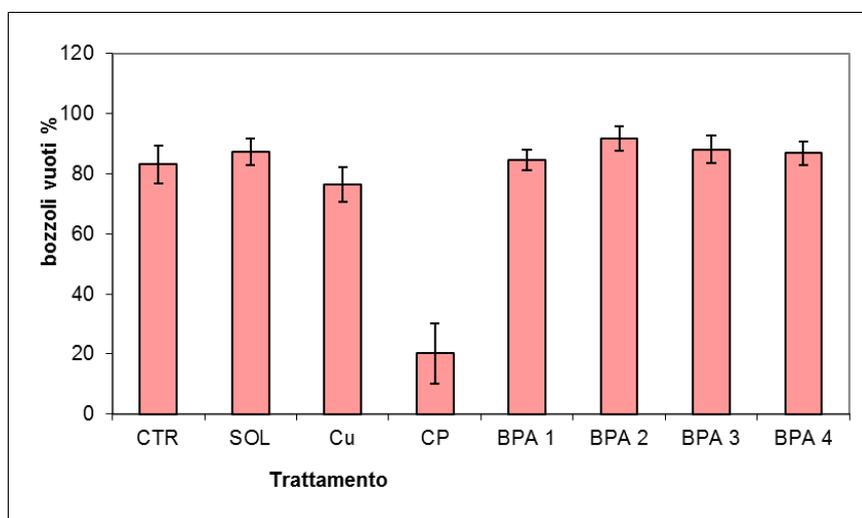


Figura 4.5: percentuale di bozzoli vuoti (schiusi) rispetto ai bozzoli totali al termine dei 56 giorni di esposizione. Per ogni trattamento è riportata la media dei valori tra le quattro repliche \pm il rispettivo errore standard.

Tabella 4.5: Tavola di ANOVA e Test di Newman-Keuls inerente le percentuali di bozzoli schiusi.

Tavola di ANOVA

Sorgente di variaz.	SS	df	MS	F	p
trattamento	15443,900	7	2206,300	17,373	0,000
residua	3047,800	24	127,000		

Test di Newman-Keuls

Trattamento	CTR	SOL	CU	CP	BPA 1	BPA 2	BPA 3	BPA 4
controllo	CTR	0,953	0,417	0,000	0,857	0,889	0,969	0,888
controllo solvente	SOL	0,953	0,664	0,000	0,938	0,850	0,917	0,955
rame 150 mg/kg	CU	0,417	0,664	0,000	0,579	0,502	0,695	0,577
chlorpyrifos 80 mg/kg	CP	0,000						
bisfenolo A 3 mg/kg	BPA 1	0,857	0,938	0,579	0,000	0,899	0,970	0,779
bisfenolo A 10 mg/kg	BPA 2	0,889	0,850	0,502	0,000	0,899	0,663	0,930
bisfenolo A 30 mg/kg	BPA 3	0,969	0,917	0,695	0,000	0,970	0,663	0,986
bisfenolo A 100 mg/kg	BPA 4	0,888	0,955	0,577	0,000	0,779	0,930	0,986

I bozzoli vuoti (schiusi), riflettono lo stesso andamento dei bozzoli totali: anche per quanto riguarda questa variabile l'ANOVA (tabella 4.5) è significativa e i test confermano che il clorpirifos è il trattamento che si discosta di più dagli altri. Tra le vaschette esposte a differenti concentrazioni di BPA non si notano differenze significative né nella produzione di bozzoli, né nella percentuale di bozzoli schiusi.

La figura 4.6 riporta il numero medio di neonati (giovani) per trattamento contati al termine dei 56 giorni di esposizione.

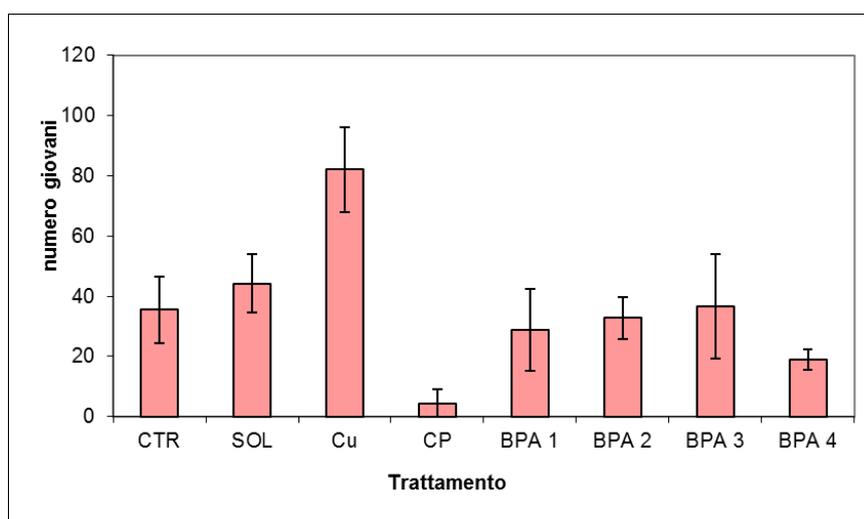


Figura 4.6: medie di neonati al termine dei 56 giorni di esposizione. Per ogni trattamento è riportata la media dei valori tra le quattro repliche \pm il rispettivo errore standard.

Tabella 4.6: Tavola di ANOVA e Test di Newman-Keuls del numero di lombrichi neonati.

Tavola di ANOVA

Sorgente di variaz.	SS	df	MS	F	p
trattamento	14104,470	7	2014,920	4,072	0,004
residua	11875,250	24	494,800		

Test di Newman-Keuls

Trattamento	CTR	SOL	CU	CP	BPA 1	BPA 2	BPA 3	BPA 4
controllo	CTR	0,844	0,033	0,310	0,904	0,863	0,950	0,723
controllo solvente	SOL	0,844	0,025	0,194	0,859	0,884	0,627	0,603
rame 150 mg/kg	CU	0,033	0,025	0,001	0,026	0,033	0,021	0,008
chlorpyrifos 80 mg/kg	CP	0,310	0,194	0,001	0,290	0,300	0,353	0,366
bisfenolo A 3 mg/kg	BPA 1	0,904	0,859	0,026	0,290	0,802	0,960	0,541
bisfenolo A 10 mg/kg	BPA 2	0,863	0,884	0,033	0,300	0,802	0,969	0,661
bisfenolo A 30 mg/kg	BPA 3	0,950	0,627	0,021	0,353	0,960	0,969	0,798
bisfenolo A 100 mg/kg	BPA 4	0,723	0,603	0,008	0,366	0,541	0,661	0,798

Il valore della tavola di ANOVA (tabella 4.6) riguardante il numero di neonati è significativo, perciò è stato effettuato il Test di Dunnett, che ha segnalato Cu come trattamento che si discosta dal controllo. Il Test di Newman-Keuls (tabella 4.6) ha confermato che il trattamento che si discosta di più dagli altri è quello del rame. Questo risultato dipende probabilmente dalla concentrazione di rame scelta per il test, che pur non rientrando in un range fisiologico risulta positiva per la riproduzione. Per quanto riguarda le vaschette del BPA, pur non essendoci differenze statisticamente significative tra le varie concentrazioni, sembra che ci sia un lieve calo del numero di neonati in corrispondenza della concentrazione più alta. Tuttavia questo dato non è sufficiente per affermare che ci sia una diminuzione dei neonati in seguito all'esposizione alla sostanza in esame. Si può concludere che a queste concentrazioni per la sostanza indagata non ci sono effetti relativi alla riproduzione.

Nessuno dei parametri del ciclo vitale è risultato sensibile alla presenza di BPA nel suolo utilizzato per il test. Questi risultati rispecchiano quelli ottenuti dai test cronici delle linee guida OECD prese come riferimento per la nostra attività sperimentale: “...no statistically significant effects were seen on the numbers of hatched cocoons, unhatched cocoons or live worms at any of the exposure levels. In the absence of any significant effects, no soil analyses were conducted”. I test a lungo termine condotti dall'OECD su suoli artificiali contaminati con il BPA non hanno rilevato effetti per quanto riguarda i parametri del ciclo vitale: “...no effects were seen with bisphenol-A at the highest concentration tested of 100 mg/kg in the long-term study”. Tuttavia i test OECD per il momento sono svolti su terreni artificiali, poco confrontabili con il terreno agricolo utilizzato in questa tesi. Il suolo utilizzato nel test (AR), è a tessitura argillosa: le argille hanno una elevata capacità di scambio cationico, perciò hanno la capacità di trattenere in soluzione cationi di metalli pesanti e di altri inquinanti. I dati di letteratura si riferiscono a test effettuati su suoli artificiali (linee guida OECD e norme ISO), o condotti su campioni di suolo prelevati da zone contaminate da acque reflue o da biosolidi (Chen et al., 2011; Lemos et al., 2009; Clarke e Smith, 2011). Dal momento che l'utilizzo del suolo naturale per i test sulla riproduzione e sulla tossicità è stato ammesso da pochi mesi dall'aggiornamento della norma ISO, potrebbe essere utile effettuare analisi chimiche a distanze di tempo regolari dall'esposizione per capire come cambia la concentrazione e la biodisponibilità di BPA in suoli agricoli come quello utilizzato in questa tesi. Partendo dai dati chimici del BPA nel suolo naturale potrebbe essere stimata l'esposizione, come percentuale di sostanza che viene realmente assunta dagli organismi.

4.2 Biomarker

4.2.1 Stabilità delle membrane lisosomiali

La stabilità delle membrane lisosomiali dei celomociti è espressa dalla percentuale di ritenzione del colorante rosso neutro. In ordinata abbiamo la percentuale di area colorata a t_{60} (dopo un'ora dalla colorazione) rispetto al t_0 (immediatamente dopo la colorazione), in funzione dei trattamenti.

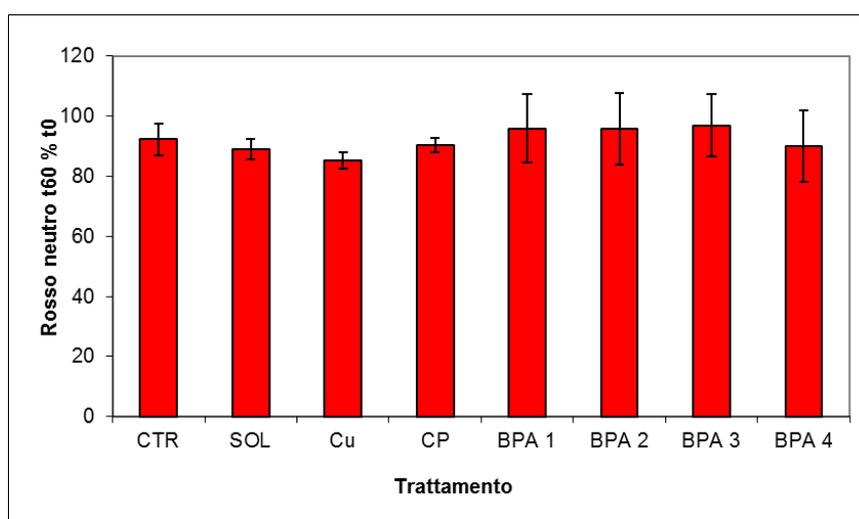


Figura 4.7: stabilità delle membrane lisosomiali di celomociti di esemplari di *Eisenia andrei*. Confronto percentuale tra il colorante trattenuto a tempo zero e dopo 60 minuti di incubazione. Per ogni trattamento è riportata la media dei valori tra le quattro repliche \pm il rispettivo errore standard.

Tabella 4.7: ANOVA della stabilità delle membrane lisosomiali.

Tavola di ANOVA

Sorgente di variaz.	SS	df	MS	F	p
trattamento	457,000	7	65,300	0,228	0,974
residua	6867,800	24	286,200		

L'ANOVA (tabella 4.7) ha dato esito non significativo, provando che non ci sono differenze rilevanti né tra né entro i trattamenti. La perdita di colorante nei lisosomi tra il t_0 e il t_{60} è minima, indicando che non ci sono danni evidenti alle membrane, e perciò la lieve destabilizzazione delle membrane è da ricondurre solo ad un effetto fisiologico di rilascio del colorante dopo un'ora di incubazione dei vetrini.

4.2.2 Accumulo lisosomiale di lipofuscine

Questo biomarker è stato valutato a partire dal calcolo dell'area di pixel colorati (in ordinata), che rappresentano la densità ottica di colorante legato alle lipofuscine presenti all'interno dei lisosomi.

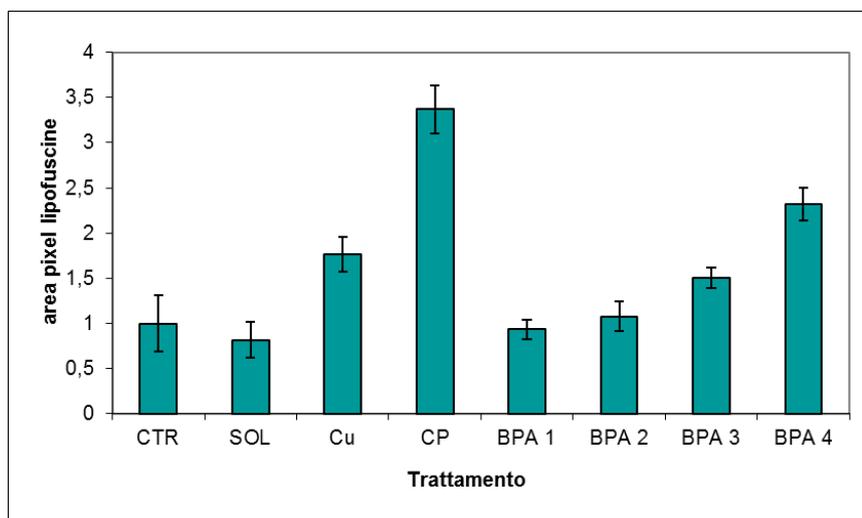


Figura 4.8: contenuto di lipofuscine all'interno dei lisosomi nelle cellule del tessuto cloragogeno di verme. I valori riportati rappresentano la media \pm la deviazione standard delle intensità di pixel ² ottenute da quattro repliche sperimentali ciascuna analizzata su due sezioni di due vermi, per un totale di quaranta immagini acquisite al microscopio per ogni trattamento.

Già dall'osservazione del grafico in figura 4.8 emerge una tendenza all'accumulo di lipofuscine all'interno dei lisosomi soprattutto in corrispondenza delle più alte concentrazioni di BPA. Anche nei controlli positivi (CP e Cu) si ha un evidente accumulo di questi pigmenti lipidici, soprattutto per quanto riguarda il clorpirifos.

Tabella 4.8: Tavola di ANOVA e Test di Newman-Keuls dell'accumulo di lipofuscine.

Tavola di ANOVA					
Sorgente di variaz.	SS	df	MS	F	p
trattamento	21,519	7	3,074	18,528	0,000
residua	3,982	24	0,166		

Test di Newman-Keuls								
Trattamento	CTR	SOL	CU	CP	BPA 1	BPA 2	BPA 3	BPA 4
controllo	CTR	0,808	0,060	0,000	0,834	0,780	0,207	0,001
controllo solvente	SOL	0,808	0,032	0,000	0,683	0,801	0,156	0,001
rame 150 mg/kg	CU	0,060	0,032	0,000	0,057	0,063	0,367	0,066
chlorpyrifos 80 mg/kg	CP	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
bisfenolo A 3 mg/kg	BPA 1	0,834	0,683	0,057	0,000		0,875	0,230
bisfenolo A 10 mg/kg	BPA 2	0,780	0,801	0,063	0,000	0,875		0,155
bisfenolo A 30 mg/kg	BPA 3	0,207	0,156	0,367	0,000	0,230	0,155	
bisfenolo A 100 mg/kg	BPA 4	0,001	0,001	0,066	0,001	0,001	0,001	0,024

L'ANOVA (tabella 4.8) è risultata significativa, ed effettuando i Test di Dunnet e di Newman-Keuls sono stati evidenziati come significativi i trattamenti del clorpirifos e del BPA 4, confermando le precedenti osservazioni.

4.2.3 Accumulo lisosomiale di lipidi neutri

L'accumulo lisosomiale di lipidi neutri è stato espresso (vedi figura 4.9) in ordinata dalla densità ottica del colorante calcolata come area di pixel, in modo analogo ai dati sulle lipofuscine.

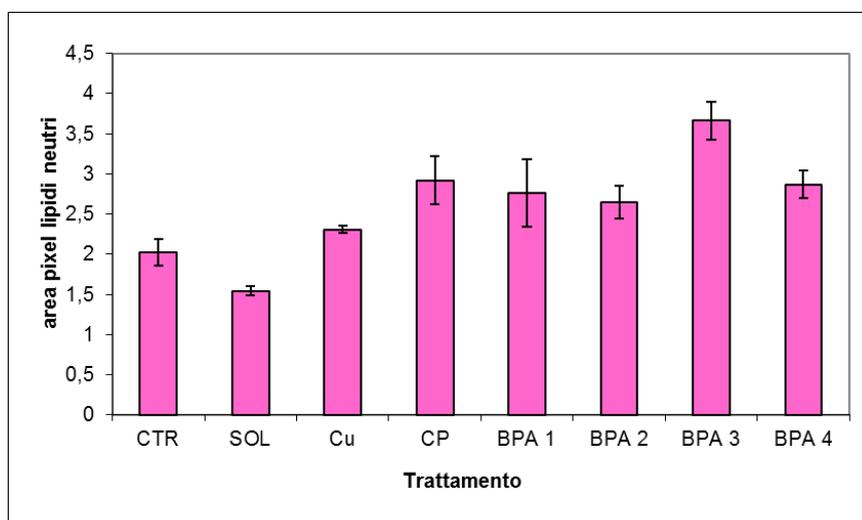


Figura 4.9: contenuto di lipidi neutri all'interno dei lisosomi nelle cellule del tessuto cloragogeno di verme. I valori riportati rappresentano le medie \pm le deviazioni standard delle intensità di pixel ² ottenute da quattro repliche sperimentali ciascuna analizzata su due sezioni di due vermi, per un totale di quaranta immagini acquisite al microscopio per ogni trattamento.

Tavola 4.9: Tavola di ANOVA e Test di Newman-Keuls dell'accumulo di lipidi neutri.

Tavola di ANOVA

Sorgente di variaz.	SS	df	MS	F	p
trattamento	11,513	7	1,645	7,769	0,000
residua	5,080	24	0,212		

Test di Newman-Keuls

Trattamento	CTR	SOL	CU	CP	BPA 1	BPA 2	BPA 3	BPA 4
controllo	CTR	0,154	0,394	0,099	0,130	0,153	0,001	0,103
controllo solvente	SOL	0,154	0,069	0,005	0,008	0,012	0,000	0,005
rame 150 mg/kg	Cu	0,394	0,069	0,348	0,349	0,300	0,004	0,332
chlorpyrifos 80 mg/kg	CP	0,099	0,005	0,348	0,883	0,838	0,031	0,870
bisfenolo A 3 mg/kg	BPA 1	0,130	0,008	0,349	0,883	0,725	0,049	0,759
bisfenolo A 10 mg/kg	BPA 2	0,153	0,012	0,300	0,838	0,725	0,034	0,784
bisfenolo A 30 mg/kg	BPA 3	0,001	0,000	0,004	0,031	0,049	0,034	0,055
bisfenolo A 100 mg/kg	BPA 4	0,103	0,005	0,332	0,870	0,759	0,784	0,055

L'accumulo di lipidi neutri è risultato maggiore nelle vaschette del BPA 3-4 e del CP.

L'ANOVA (tabella 4.9) è risultata significativa. Il test di Dunnett ha indicato come trattamento che si discosta di più dal controllo il BPA 3. Il test di Newman-Keuls ha segnalato che i trattamenti che si discostano di più dagli altri sono il BPA 3, e in misura minore, il controllo-solvente (SOL). Anche se l'andamento non è lineare, l'accumulo di lipidi neutri è evidente in corrispondenza delle vaschette esposte alle concentrazioni più alte di BPA rispetto ai livelli di CTR e SOL.

L'accumulo di lipofuscine e di lipidi neutri in seguito all'esposizione al BPA è indice rispettivamente di stress ossidativo e di un alterato metabolismo dei lipidi. Soprattutto per l'accumulo dei lipidi neutri, gli effetti sono probabilmente da mettere in correlazione con le caratteristiche obesogene di questo interferente endocrino. Studi recenti hanno messo in evidenza come il BPA possa indurre un accumulo di lipidi neutri in colture di cellule epatiche umane (Huc et al., 2012), e in cellule epatiche di ratto (Grasselli et al., 2013). Questo è il primo studio che analizza tale parametro e quindi non ci sono precedenti evidenze dell'accumulo dei lipidi neutri nei lombrichi. Questi risultati pertanto sono un primo passo per lo studio degli effetti metabolici del BPA in questi organismi sentinella. Le lipofuscine sono accumuli di proteine e lipidi, con l'aggiunta di contaminanti come i metalli. Come tali, sono considerate una conseguenza dello stress ossidativo ma anche di alterato metabolismo cellulare. Resta da approfondire se vi sia una relazione specifica con il BPA.

4.2.4 Attività dell'enzima Acetilcolinesterasi

L'attività dell'enzima acetilcolinesterasi è stata espressa in nanomoli al minuto di enzima per milligrammo di proteina (velocità di produzione del prodotto a partire dal substrato acetiltiocolina). Dal grafico in figura 4.10 si nota come l'unico trattamento che ha subito una forte inibizione è il CP, mentre gli altri trattamenti non si discostano molto l'uno dall'altro.

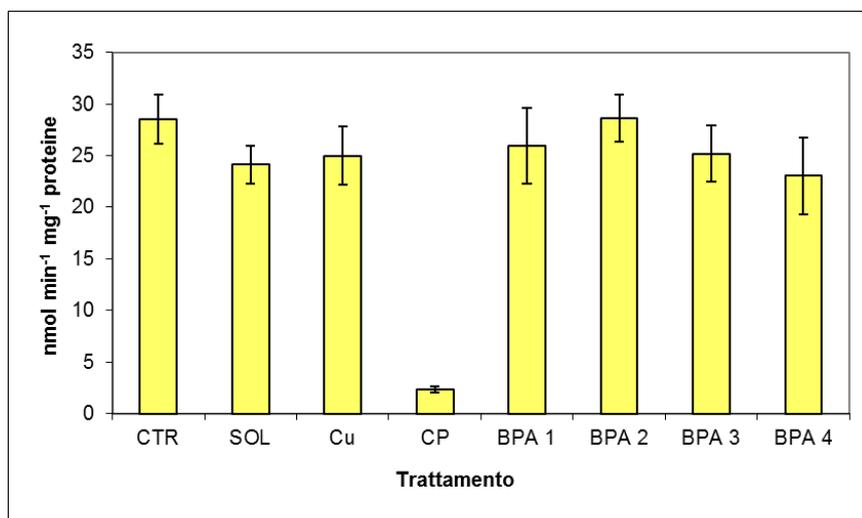


Figura 4.10: I valori riportati rappresentano le medie \pm le deviazioni standard dell'attività dell'enzima acetilcolinesterasi ottenute da quattro repliche sperimentali su celomociti di verme, espresse come velocità di reazione in nanomoli al minuto per milligrammo di proteina.

Tabella 4.10: tavola di ANOVA e Test di Newman-Keuls dell'attività dell'acetilcolinesterasi.

Tavola di ANOVA

Sorgente di variaz.	SS	df	MS	F	p
trattamento	2029,410	7	289,920	10,208	0,000
residua	681,600	24	28,400		

Test di Newman-Keuls

Trattamento		CTR	SOL	CU	CP	BPA 1	BPA 2	BPA 3	BPA 4
controllo									
controllo solvente	CTR		0,769	0,785	0,000	0,502	0,975	0,657	0,694
rame 150 mg/kg	SOL	0,769		0,820	0,000	0,961	0,833	0,956	0,775
chlorpyrifos 80 mg/kg	CU	0,785	0,820		0,000	0,965	0,866	0,956	0,863
bisfenolo A 3 mg/kg	CP	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000
bisfenolo A 10 mg/kg	BPA 1	0,502	0,961	0,965	0,000		0,758	0,843	0,935
bisfenolo A 30 mg/kg	BPA 2	0,975	0,833	0,866	0,000	0,758		0,798	0,749
bisfenolo A 100 mg/kg	BPA 3	0,657	0,956	0,956	0,000	0,843	0,798		0,939
			0,775	0,863	0,000	0,935	0,749	0,939	

L'ANOVA (riportata nella tabella 4.10) è risultata significativa, per cui sia dal Test di Dunnet sia da quello di Newman-Keuls è emerso che l'unico trattamento significativamente diverso dagli altri è il CP, come ci si aspettava dal momento che questo biomarker è specifico per la valutazione dell'effetto di insetticidi dall'azione neurotossica. Alle condizioni sperimentali testate non è possibile attribuire ai lombrichi esposti al BPA un effetto di inibizione dell'attività di questo enzima.

4.2.5 Attività dell'enzima Catalasi

L'attività della catalasi è stata espressa come velocità di conversione (unità enzimatiche per milligrammo di proteine) da parte dell'enzima del perossido di idrogeno in acqua e ossigeno all'interno delle cellule di verme (vedi figura 4.11).

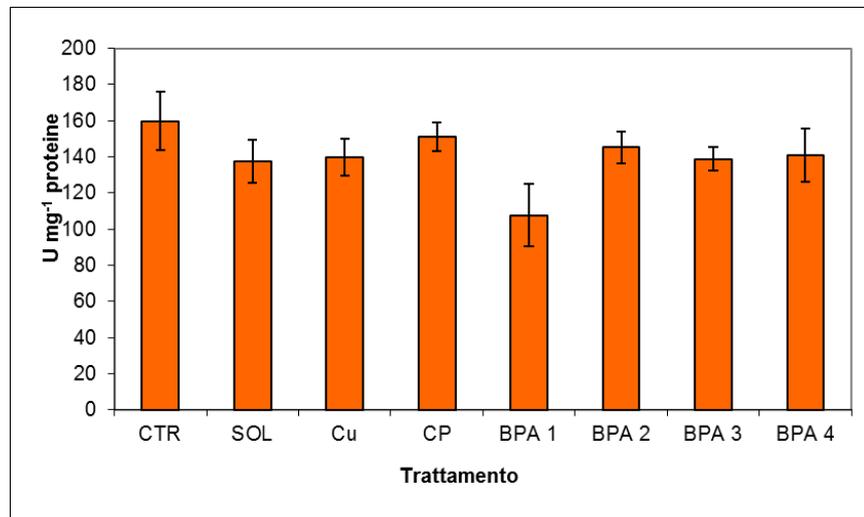


Figura 4.11: I valori riportati rappresentano le medie \pm le deviazioni standard dell'attività dell'enzima catalasi, ottenute da quattro repliche sperimentali su omogenati di verme, ed espresse come unità enzimatiche per milligrammo di proteine.

Tabella 4.11: ANOVA dell'attività dell'enzima catalasi.

Tavola di ANOVA

Sorgente di variaz.	SS	df	MS	F	p
trattamento	6416	7	917	1,536	0,203
residua	14318	24	597		

L'ANOVA (tabella 4.11) è risultata non significativa, quindi nessun trattamento si discosta in modo significativo dagli altri, né dal controllo, perciò non è possibile affermare che alle condizioni testate ci sia un effetto di attivazione di risposte antiossidanti.

4.2.6 Attività dell'enzima Glutatione-S-Transferasi

L'attività dell'enzima GST è stata espressa in termini di milli-unità di enzima per milligrammo di proteine, unità di misura che rappresenta la velocità di coniugazione del substrato da parte dell'enzima (vedi figura 4.12).

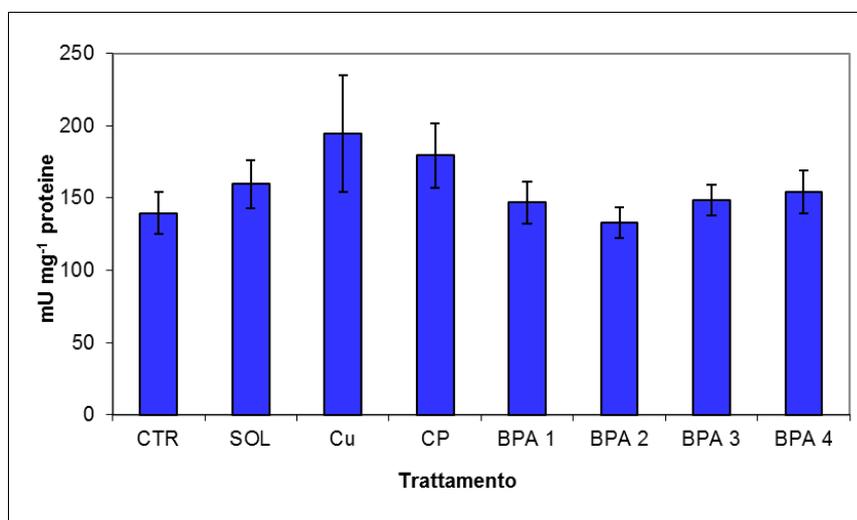


Figura 4.12: I valori riportati rappresentano le medie \pm le deviazioni standard dell'attività dell'enzima glutatione-s-transferasi, ottenute da quattro repliche sperimentali su omogenati di verme, ed espresse come milli-unità enzimatiche per milligrammo di proteine.

In un primo momento la condizione di omogeneità della varianza non veniva soddisfatta, poiché il test di Cochran dava esito negativo, ma con una semplice trasformazione logaritmica dei dati è stata soddisfatta.

Tabella 4.12: ANOVA dell'attività dell'enzima GST.

Tavola di ANOVA					
Sorgente di variabilità	SS	df	MS	F	p
trattamento	12004	7	1715	1,050	0,424
residua	39200	24	1633		

L'ANOVA (tabella 4.12) è risultata non significativa, quindi non ci sono trattamenti che si discostano significativamente dagli altri e/o dal controllo, ciò significa che alle concentrazioni testate non sono intervenuti meccanismi di detossificazione cellulari.

4.2.7 Malondialdeide

Il contenuto di molecole di MDA legate alle molecole di NMPI è stato espresso in nanomoli di MDA per milligrammo di proteine (figura 4.13). Le repliche a disposizione per questo biomarker erano 2 per trattamento (mentre per gli altri biomarker erano 4).

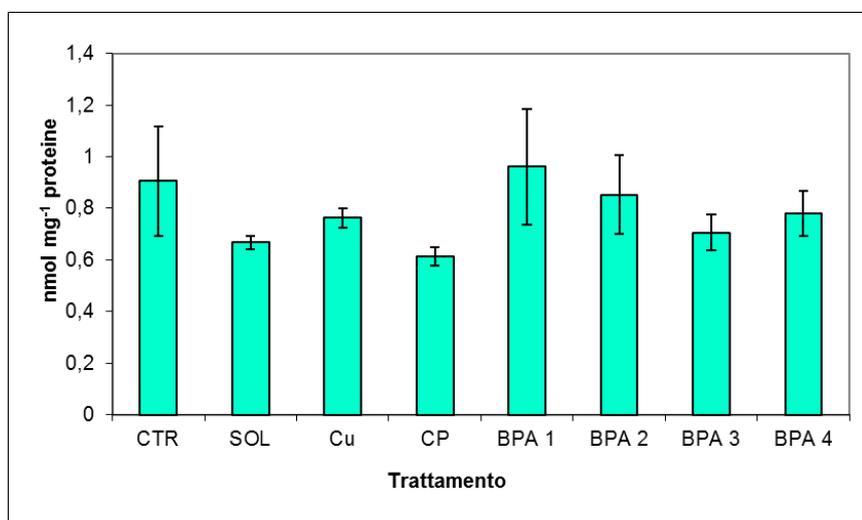


Figura 4.13: I valori riportati rappresentano le medie \pm le deviazioni standard del contenuto di malondialdeide, ottenute da due repliche sperimentali su omogenati di verme, ed espresse in nanomoli per milligrammo di proteine.

Tabella 4.13: ANOVA del contenuto di MDA.

Tavola di ANOVA					
Sorgente di variaz.	SS	df	MS	F	p
trattamento	0,200	7	0,029	0,853	0,576
residua	0,268	8	0,033		

L'ANOVA (tabella 4.13) non è significativa, perciò non è possibile affermare che ci sia stato un effetto dovuto alla perossidazione lipidica.

Nessuno dei biomarker enzimatici (AChE, CAT, GST, MDA) ha dato risultati significativi, quindi il BPA non sembra attivare enzimi detossificanti (CAT e GST), indurre perossidazione lipidica (MDA) oppure alterare la funzione dell'AChE, che tipicamente viene inibita dai pesticidi ma negli invertebrati può essere alterata anche da altri contaminanti, magari differenti nelle diverse specie.

5. Conclusioni

Lo studio è stato condotto con il fine di valutare se il BPA, contaminante emergente che sta ponendo grande preoccupazione come interferente endocrino nei mammiferi, induca effetti avversi su organismi sentinella nei suoli. L'inquinamento dei suoli è tuttora oggetto di poca attenzione, e non sono disponibili informazioni precedenti relativi agli effetti del BPA sui parametri del ciclo vitale e su parametri biochimici e fisiologici di organismi del suolo investigati nel presente lavoro di Tesi.

La batteria di test è stata composta includendo parametri meno sensibili ma più ecologicamente rilevanti (endpoint del ciclo vitale) ed altri più sensibili e precoci nella risposta ma non necessariamente predittivi sulla salute della comunità. Sulla base dei dati ottenuti possiamo dire che il BPA, alle concentrazioni ambientali, non costituisce un elemento di rischio ecologico per gli organismi sentinella *Eisenia andrei*. Alle concentrazioni più elevate (che superano quelle ambientali di almeno 10 volte) si osservano delle alterazioni sui livelli di lipidi neutri e di lipofuscine che pur non essendo preoccupanti dal punto di vista ecologico sono indice di vulnerabilità, dato che si tratta di alterazioni del metabolismo in conseguenza delle quali gli animali accumulano residui normalmente degradati a livello lisosomiale. Questo accumulo nei lisosomi delle cellule del tessuto cloragogeno dei vermi, che rivestono il tubo digerente, sembrano indicare una esposizione attraverso la dieta a seguito della ingestione del terreno. E' interessante il fatto che l'accumulo di lipidi è in linea con le caratteristiche obesogene del BPA, ben manifestate nei mammiferi, uomo compreso. Tuttavia non ci sono ancora conoscenze sufficienti per stabilire se questo accumulo nei vermi sia dovuto ad una specifica alterazione degli enzimi di sintesi dei lipidi oppure più genericamente ad un aumento dello stress ossidativo. Molti studi stanno valutando la capacità del BPA di alterare la sintesi e il rilascio di lipidi in cellule umane e di ratto, ma non ci sono ancora studi di questo tipo per gli organismi del suolo. E' auspicabile che questo aspetto venga approfondito, ed eventualmente venga identificato un nuovo biomarker specifico dell'azione del BPA sull'accumulo di lipidi.

Un altro aspetto che sarà interessante approfondire è il bioaccumulo: la valutazione del rischio ecotossicologico di una sostanza si basa anche sul potenziale di BCF che può essere pericoloso per il biota (incluso l'uomo) per trasferimento nella catena trofica. Considerando che non esistono ancora studi specifici del bioaccumulo del BPA in

organismi del suolo, ed avendo messo in luce che l'assunzione della sostanza è avvenuta (probabilmente per via alimentare) ci si pone l'obiettivo futuro di valutare questo parametro nei lombrichi, in modo da avere un quadro più ampio degli effetti associati a questo interferente endocrino nei suoli.

6. Bibliografia

- ▲ Adams L.A., Angulo, P., (2005), Recent concepts in non-alcoholic fatty liver disease, *Diabet. Med.* vol. 22, pp. 1129-1133.
- ▲ Alonso-Magdalena P., (2006), The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance, *Environ Health Perspect*; vol.114, pp. 106-112.
- ▲ Bae S., Kim J.H., Lim Y.H., Park H.Y., and Hong Y.C., (2012), Associations of bisphenol A exposure with heart rate variability and blood pressure, *Hypertension*, vol. 60, pp. 786–793.
- ▲ Ballard B.D., Mackay A.A., (2005), Estimating the removal of anthropogenic organic chemicals from raw drinking water by coagulation flocculation, *J. Environ. Eng.*, vol. 131, pp. 108-118.
- ▲ Biagini B., Barbuto M., Zullini A., (2006), Bioindicatori della qualità del suolo, *Biologia Ambientale*, vol. 20 (2): pp. 19-41.
- ▲ Bishop-Bailey D., Hla T., Warner T.D., (2000), Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) is a PPARgamma agonist in an ECV304 cell line, *British Journal of Pharmacology*, vol. 131, pp. 651-654.
- ▲ Bolli A., Bulzomi P., Galluzzo P., Marino M., Molteplici meccanismi esercitati dal Bisfenolo A come interferente degli ormoni steroidei femminili, Dipartimento di Biologia, Università “Roma TRE”, Roma (PROGETTO PREVIENI)
http://www.iss.it/binary/prvn/cont/PREVIENI_Poster_Book.pdf.
- ▲ Bonaccorsi L., Nosi D., Quercioli F., Formigli L., Zecchi S., Maggi M., Forti G., Baldi E., (2008), Prostate cancer: a model of integration of genomic and non-genomic effects of the androgen receptor in cell lines model, *Steroids*, vol. 73, pp. 1030-1037.
- ▲ Braun J.M., Kalkbrenner A.E., Calafat A.M., Bernert J.T., Ye X., Silva M.J., Barr D.B., Sathyanarayana S., Lanphear B.P., (2011), Variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations during pregnancy, *Environ Health Perspect*, vol. 119 (1), pp. 131-137.
- ▲ Calafat A.M., Ye X., Wong L.Y., Reidy J.A., Needham J.L., (2008), Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004, *Environ Health Perspect* vol. 116, pp. 39–44.

- △ Chen F., Ying G.G., Kong L.X., Wang L., Zhao J.L., Zhou L.J., Zhang L.J., (2011), Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei, China, *Environmental Pollution*, vol. 159, issue 6, pp. 1490-1498.
- △ Clarke B.O., Smith S.R., (2011), Review of ‘emerging’ organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids, *Environment International*, vol. 37, pp. 226–247.
- △ Cortet, J., Gomot-De Vaufleury A., Poinso-Balaguer N., Gomot L., Texier C., Cluzeau D., (1999), The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects, *European Journal of Soil Biology*, Vol. 35 (3), pp. 115-134.
- △ Cousins I.T., Staples C.A., Klecka G.M., Mackay D., (2002), A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A, *Hum. Ecol. Risk Assess.*, vol. 8, pp. 1107-1135.
- △ Crain D.A., Eriksen M., Iguchi T., Jobling S., Laufer H., LeBlanc G.A., Guillette L.J., (2007), An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology, *Reprod. Toxicol.*, vol. 24, pp. 225-239.
- △ Del Rio D., Stewart A.J., Pellegrini N., (2005), A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress, *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, vol. 15 (4), pp. 316-328.
- △ Depledge M. H., (1989), The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In Depledge M. H.: *The rational basis for detection of early effects of marine pollutants using physiological indicators*. *AMBIO*, 18: 301.
- △ Depledge M. H., (1994), The rational basis for use of biomarkers as ecotoxicological tools. in Fossi, M.C., Leonzio, C.: *Nondestructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis Publishers, CRC Press, US: 271-295.
- △ Domínguez J., and Edwards C. A., (1997), Effects of stocking rate and moisture content on the growth and maturation of *Eisenia andrei* (Oligochaeta) in pig manure, *Soil Biol. Biochem*, vol. 29, pp. 743–746.
- △ Domínguez J., Briones M. J. I., and Mato S., (1997), Effect of diet on growth and reproduction of *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Lumbricidae), *Pedobiologia*, vol. 41, pp. 566–576.
- △ Dominguez J., Edwards C.A., (2011), Biology and Ecology of Earthworm Species Used for Vermicomposting, in *Vermiculture Technology, Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management*, Taylor & Francis Group, LLC, pp. 27–

40.

- △ Domínguez J., Edwards C.A., Webster M., (2000), Vermicomposting of sewage sludge: effect of bulking materials on the growth and reproduction of the earthworm *Eisenia andrei*, *Pedobiologia*, vol. 44, pp. 24-32.
- △ Domouhtsidou G.P., Dimitriadis V.K. (2001), Lysosomal and lipid alterations in the digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.) as biomarkers of environmental stress, *Environ. Pollut.*, vol. 115, pp. 123–137.
- △ Dorn P.B., Chou C.-S., Gentempo J.J., (1987), Degradation of bisphenol A in natural waters, *Chemosphere*, vol. 16, pp. 1501-1507.
- △ Edwards C.A., (1988), Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworms, in *Earthworms in Waste and Environmental Management*, ed. C. A. Edwards and E. F. Neuhauser, pp. 21–31. SPB, the Hague, the Netherlands.
- △ Enciclopedia della Scienza e della Tecnica, 2008, <http://www.treccani.it/enciclopedia/catalasi>.
- △ Enciclopedia della Scienza e della Tecnica, 2008, <http://www.treccani.it/enciclopedia/glutatione>.
- △ Environment Canada, 2008, Screening Assessment for the Challenge: Phenol, 4,40-(1-Methylethylidene) bis-Bisphenol A. Chemical Abstracts Service Registry Number 80-05-7. Gatineau, Quebec. Retrieved on January 20, 2012, <http://www.ec.gc.ca/ese-ees/default.asp?lang¼En&n¼3C756383-1#a9>.
- △ Fent G., Hein W.J., Moendel M.J., Kubiak R., (2003), Fate of 14C-bisphenol A in soils, *Chemosphere*, vol. 51, pp. 735-746.
- △ Fernandez M.F., Arrebola J.P., Taoufiki J., Navalón A., Ballesteros O., Pulgar R., Vilchez J.L., Olea N., (2007), Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women, *Reprod Toxicol*, vol. 24 (2), pp. 259-264.
- △ Ferrara G., Loffredo E., Senesi N., (2006), Phytotoxic, clastogenic and bioaccumulation effects of the environmental endocrine disruptor bisphenol A in various crops grown hydroponically, *Planta*, vol. 223 (5), pp. 910-916.
- △ Fleisch A.F., Sheffield P.E., Chinn C., Edelstein B.L., Landrigan P.J., (2010), Bisphenol A and related compounds in dental materials, *Pediatrics*, vol. 126 (4), pp. 760-768.
- △ Flint S., Markle T., Thompson S., Wallace E., (2012), Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective, *Journal of Environmental Management*,

vol. 104, pp. 19-34.

- △ Fujimoto V.Y., Kim D., Vom Saal F.S., Lamb J.D., Taylor J.A., Bloom M.S., (article in press), Serum unconjugated bisphenol A concentrations in women may adversely influence oocyte quality during in vitro fertilization, *Fertility and Sterility*.
- △ Glagau H., Hauck R.S., (1994), "Kit and method for determining redox status in urine" United States Patent ,6.835.554.
- △ Grasselli E., Cortese K., Voci A., Vergani L., Fabbri R., Barmo C., Gallo G., Canesi L., (2013), Direct effects of Bisphenol A on lipid homeostasis in rat hepatoma cells, *Chemosphere*, article in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.016>.
- △ Gutteridge J.M., Halliwell B., (1989), Iron toxicity and oxygen radicals, *Baillieres Clin Haematol.*, vol. 2 (2), pp. 195-256.
- △ Hanaoka T., (2002), Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents., *Occup Environ Med*, vol. 59, pp. 625-628.
- △ Hartenstein, R., Neuhauser, E. F., and Kaplan, D. L., (1979), Reproductive potential of the earthworm *Eisenia foetida*. *Oecologia*, vol. 43, pp. 329–340.
- △ Heemken O.P., Reincke H., Stachel B., Theobald N., (2001), The occurrence of xenoestrogens in the Elbe river and the North Sea, *Chemosphere*, vol. 5, pp. 245-259.
- △ Heinonen J., Honkanen J., Kukkonen J.V.K., Holopainen I.J., (2002), Bisphenol A accumulation in the freshwater clam *Pisidium amnicum* at low temperatures, *Arch Environ Contam Toxicol*, vol. 43, pp. 50-55.
- △ Howard, P.H., (1989), *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data*, vol. 1., Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- △ Huc L., Lemarié A., Guéraud F., Héliers-Toussaint C., (2012), Low concentrations of bisphenol A induce lipid accumulation mediated by the production of reactive oxygen species in the mitochondria of HepG2 cells, *Toxicology in Vitro*, vol. 26, pp. 709–717.
- △ Hugo E.R., Brandebourg T.D., Woo J.G., Loftus J., Alexander J.W., Ben-Jonathan N., (2008), Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes, *Environmental Health Perspectives*, vol. 116, no. 12, pp. 1642–1647.

- ^ INSERM, Institut national de la santé et de la recherche médicale (2011) Reproduction et environnement. Expertise collective. INSERM, (INSERM, Paris).
- ^ Iordanidou A., Hadzopoulou-Cladaras M., Lazou A., (2010), Non-genomic effects of thyroid hormone in adult cardiac myocytes: relevance to gene expression and cell growth. *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 340, pp. 291-300.
- ^ Jakoby W.B., (1978), The glutathione S – transferases: a group of multifunctional detoxification proteins, *Advanced Enzymology*, vol. 46, pp. 383 – 411.
- ^ Kang J.H., (2006), Human exposure to bisphenol A., *Toxicology*, vol. 226, pp. 79-89.
- ^ Kang J.H., Aasi D., Katayama Y., (2007), Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 37, pp. 607-625.
- ^ Kinney C.A., Furlong E.T., Zaugg S.D., Burkhardt M.R., Werner S.L., Cahill J.D., Jorgensen G.R., (2006), Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 40, pp. 7207-7215.
- ^ Kitamura S., (2005), Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds., *Toxicol Sci*, vol. 84, pp. 249-259.
- ^ Kookana R.S., Ying G., (2005), Sorption and degradation of estrogen-like-endocrine disrupting chemicals in soil, *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 24, Issue 10, pp. 2640–2645.
- ^ Koponen P.S., Tuikka A., Kukkonen J.V.K., (2007), Effects of ultraviolet-B radiation and larval growth on toxicokinetics of waterborne bisphenol A in common frog (*Rana temporaria*) larvae, *Chemosphere*, vol. 66, pp.1323-1328.
- ^ Kwintkiewicz J., Nishi Y., Yanase T., Giudice L.C., (2010), Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma mediates bisphenol A inhibition of FSH-stimulated IGF-1, aromatase, and estradiol in human granulosa cells, *Environmental Health Perspectives*, vol. 118, pp. 400-406.
- ^ Lang I.A., Galloway T.S., Scarlett A., Henley W.E., Depledge M., Wallace R.B., Melzer D., (2008), Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults, *Journal of the American Medical Association*, vol. 300, no.11, pp.1303–1310.
- ^ Le H.H., Carlson E.M., Chua J.P., Belcher S.M., (2008), Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen

in developing cerebellar neurons, *Toxicol Lett*, vol. 176, pp.149–156.

- ▲ Lee H.C., Soyano K., Ishimatsu A., Nagae M., Kohra S., Ishibashi Y., Arizono K., Takao Y., (2004), Bisphenol A and nonylphenol bioconcentration in spotted halibut *Varaspar variegates*, *Fisheries Science*, vol. 70, pp. 192-194.
- ▲ Lemos M.F.L., van Gestel C.A.M., Soares A.M.V.M., (2009), Endocrine disruption in a terrestrial isopod under exposure to bisphenol A and vinclozolin, *J. Soil Sediments*, vol. 9, pp. 492-500.
- ▲ Li J., Zhou B., Shao J., Yang Q., Liu Y., Cai W., (2007), Influence of the presence of heavy metals and surface-active compounds on the sorption of bisphenol A to sediment, *Chemosphere*, vol. 68, issue 7, pp. 1298-1303.
- ▲ Liu J., Wang R., Huang B., Lin C., Zhou J., Pan X., (2012), Biological effects and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in high-back crucian carp exposed to wastewater treatment plant effluents, *Environmental Pollution*, vol. 162, pp. 325-331.
- ▲ Loffredo E., Senesi N., (2006), Fate of anthropogenic organic pollutants in soils with emphasis on adsorption/desorption processes of endocrine disruptor compounds, *Pure Appl. Chem.*, vol. 78, pp. 947-961.
- ▲ Mannervik B.U., Danielson H., (1988), Glutathione transferases—structure and catalytic activity, *CRC Critical reviews in Biochemistry*, vol. 23, pp. 283 – 337.
- ▲ Marnett L.J., (1999), Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde, *Mutat Reüs*, vol. 424 (1-2), pp. 83-95.
- ▲ Matsushima A., Kakuta Y., Teramoto T., Koshiha T., Liu X., Okada H., Tokunaga T., Kawabata S., Kimura M., Shimohigashi Y., (2007), Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR gamma, *J. Biochem.*, vol. 142 (4), pp. 517–524.
- ▲ Metcalfe C.D., Metcalfe T.L., Kiparissis Y., Koenig B., Khan C., Hughes R.J., Croley T.R., March R.E., Thomas P., (2001), Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 20 (2), pp. 297-308.
- ▲ Minoia C., Leoni E., Turci R., Signorini S., Moccaldi A., Imbriani M., (2008), Interferenti endocrini, schede monografiche: BISFENOLO A, *G Ital Med Lav Erg*, vol. 30 (3), pp. 214-224.
- ▲ Monroy F., Aira M., Domínguez J., Velando A., (2006), Seasonal population

dynamics of *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Oligochaeta, Lumbricidae) in the field. *C.R. Biol.*, vol. 329, pp. 912–915.

- ▲ Moore M.N., (1988), Cytochemical responses of the Lysosomal system and NADPH – ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 46, pp. 81 -89.
- ▲ NTP National Toxicology Program (2008) NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A., NIH, No. 08-5994 (NIH, Research Triangle Park, NC).
- ▲ Oehlmann J., Schulte-Oehlmann U., Kloas W., Jagnytsch O., Lutz I., Kusk K.O., Wollenberger L., Santos E.M., Paull G.C., Van Look K.J., Tyler C.R., (2009), A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, vol. 364 (1526), pp. 2047-2062.
- ▲ Palinski W., Ord V.A., Plump A.S., Breslow J.L., Steinberg D., Witztum J.L., (1994), ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum, *Arterioscler Thromb*, vol. 14 (4), pp. 605-616.
- ▲ Peakall D.B., Shugart L.R., (1993), Biomarkers: research and application in the assessment of environmental health. NATO ASI, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, H68:31-48.
- ▲ Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., de Tata V., Casini, A.F., (2003), The changing faces of glutathione, a cellular protagonist, *Biochem. Pharmacol.*, vol. 66, pp. 1499-1503.
- ▲ Regoli F., (1992), Lysosomas responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution, *Marine ecology progress series.*, Oldendorf, vol. 84 (1), pp. 63-69.
- ▲ Reinecke, A. J., and Viljoen, S. A., (1990), The influence of worm density on growth and cocoon production of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta), *Rev. Ecol. Biol. Sol*, vol. 27 (2), pp. 221–230.
- ▲ REPORT UE (2003), European-Union. Risk Assessment Report-4,4'-isopropylidenediphenol (Bisphenol A), [http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/ Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/ REPORT/ bisphenolareport325.pdf](http://ecb.jrc.it/DOCUMENTS/Existing-Chemicals/RISK_ASSESSMENT/REPORT/bisphenolareport325.pdf).
- ▲ Reynolds J.W., (1977), The earthworms (Lumbricidae and Sparganophilidae) of

Ontario. Life Sciences Miscellaneous Publications, Royal Ontario Museum, Toronto, Ontario, Canada, pp. 141.

- △ Reynolds, J.W., Wetzel M.J., (2004), The terrestrial Oligochaeta (Annelida: Clitellata) of North America north of Mexico, *Megadrilogica*, vol. 9 (11), pp. 71-98.
- △ Rubin B.S., Soto A.M., (2009), Bisphenol A: perinatal exposure and body weight, *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 304, no. 1-2, pp. 55–62.
- △ Rubin M.M., (2007), Antenatal exposure to DES: lessons learned...future concerns, *Obstet Gynecol Surv*, vol. 62 (8), pp. 548-55.
- △ Shankar A., Teppala S., (2011), Relationship between urinary bisphenol A levels and diabetes mellitus,” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 96, pp. 3822–3826.
- △ Shankar A., Teppala S., (2012), Urinary bisphenol A and hypertension in a multiethnic sample of US adults, *Journal of Environmental and Public Health*.
- △ Shankar A., Teppala S., Sabanayagam C., (2012), Urinary Bisphenol-A Levels and Measures of Obesity: Results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2008, *ISRN Endocrinology*.
- △ Shao B., Han H., Li D., Ma Y., Tu X., Wu Y., (2007), Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *Food Chem*, vol. 105, pp. 1236-1241.
- △ Shareef A., Angove M.J., Wells J.D., Johnson B.B., (2006), Aqueous solubilities of estrone, 17b-estradiol, 17a-ethynylestradiol, and bisphenol, *A. J. Chem. Eng. Data*, vol. 51, pp. 879-881.
- △ Sidhu S., Gullett B., Striebich R., Klosterman J., Contreras J., DeVito M., (2005), Endocrine disrupting chemical emissions from combustion sources: diesel particulate emissions and domestic waste open burn emissions, *Atmos. Environ*, vol. 39, pp. 801-811.
- △ Silver M.K., O’Neill M.S., Sowers M.R., Park S.K., (2011), Urinary bisphenol A and type-2 diabetes in U.S. adults: data from NHANES, 2003–2008, *PLoS ONE*, <http://www.plosone.org/article/metrics/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0026868;jsessionid=162E92FC4DE209DF5A587106FB120183.ambra01>.
- △ Slatter D.A., Bolton C.H., Bailey A.J., (2000), The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus, *Diabetologia*, vol. 43, pp. 550-557.
- △ Stahlhut R.W., Welshons W.V., Swan S.H., (2009), Bisphenol A Data in NHANES

- Suggest Longer than Expected Half-Life, Substantial Nonfood Exposure, or Both, *Environ Health Perspect*, vol. 117, pp. 784-789.
- △ Staples C.A., Dorn P.B., Klecka G.M., Branson D.R., O'Block S.T., Harris L.R., (1998), A Review of the Environmental Fate, Effects and Exposures of Bisphenol A, *Chemosphere*, vol. 36, pp. 2149-2173.
 - △ Sugiura-Ogasawara M., (2006), Limitations of a case-control study on bisphenol A (BPA) serum levels and recurrent miscarriage, *Human Reproduction*, vol. 21, pp. 566-567.
 - △ Sun H., (2006), Effect of bisphenol A, tetrachlorobisphenol A and pentachlorophenol on the transcriptional activities of androgen receptor-mediated reporter gene, *Food Chem Toxicol*, vol. 44, pp. 1916-1921.
 - △ Takahashi A., Higashitani T., Yakou Y., Saitou M., Tamamoto H., Tanaka H., (2003), Evaluating bioaccumulation of suspected endocrine disruptors into periphytons and benthos in the Tama River, *Water Sci Technol*, vol. 47 (9), pp. 71-76.
 - △ Takeda Y., Liu X., Sumiyoshi M., Matsushima A., Shimohigashi M., Shimohigashi Y., (2009), Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ER- γ among the human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERR γ isoform, *J. Biochem.*, vol. 146 (1), pp. 113-22.
 - △ Takeuchi T., (2002), Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 291, pp. 76-78.
 - △ Takeuchi T., (2004), Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J*, vol. 51, pp. 165-169.
 - △ Terman A., (2001). Garbage catastrophe theory of aging: imperfect removal of oxidative damage?, *Redox Rep.*, vol. 6, pp. 15-26.
 - △ Terman A., Brunk U.T., (1998), Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age., *APMIS*, vol. 106, pp. 265-276.
 - △ Tsai W.T., (2006), Human health risk on environmental exposure to bisphenol-A: a review, *J. Environ. Sci. Health C*, vol. 24, pp. 225-255.
 - △ Ubert M., Nef S., Soto A.M., (2009), Special Issue: Endocrine Disruptors from the Environment in the Aetiology of Obesity and Diabetes, *Mol. Cell. Endocrinol*, vol. 304, pp. 100-106.

- △ Uchida K., (2000), Cellular response to bioactive lipid peroxidation products, *Free Radic Res*, vol. 33 (6), pp. 731-737.
- △ US Environmental Protection Agency, (2010), *Bisphenol A Action Plan*. Washington D.C., USA.
- △ Vandenberg L.N., (2009), Bisphenol-A and the Great Divide: A Review of Controversies in the Field of Endocrine Disruption, *Endocrine Reviews*, February, vol. 30, no. 1, pp. 75-95.
- △ Vandenberg L.N., Hauser R., Marcus M., Olea N., Welshons W.V., (2007), Human exposure to bisphenol A (BPA), *Reprod Toxicol*, vol. 24, pp. 139–177.
- △ Viarengo A., Canesi L., Pertica M., Poli G., Moore M.N., Orunesu M., (1990), Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *mytilus galloprovincialis lam*, *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 97 C, pp. 37 - 42.
- △ Viarengo A., Pons G., Fabbri R., Mozzone S., Evangelisti V., Capri F., (1998), Evaluation of the physiological status of *Chamela gallina* using biomarkers, *Biol. Mar. Medit.*, vol. 5, pp. 1-10.
- △ Vidal M.L., Rouimi P., Debrauwer L., Narbonne J.F., (2002), Purification and characterisation of glutathione S – transferases from the freshwater clam *Corbicula fluminea* (muller), *Comparative Biochemistry and physiology part c*, vol. 131, pp. 477 – 489.
- △ Vogel S.A., (2009), The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A“Safety”, *Am J Public Health*, vol 99, pp. 559–566.
- △ Volkel W., Colnot T., Csanady G.A., Filser J.G., Dekant W., (2002), Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration, *Chem Res Toxicol.*, vol. 15, pp. 1281-1287.
- △ Voordeckers J.W., Fennell D.E., Jones K., Haggblom M.M., (2002), Anaerobic biotransformation of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, and bisphenol A in estuarine sediments, *Environ Sci Technol*, vol. 36, pp. 696–701.
- △ Watanabe H., Tsukamoto J., (1976), Seasonal change in size, class and stage structure of lumbricid *Eisenia foetida* population in a field compost and its practical application as the decomposer of organic waste matter, *Rev. Ecol. Biol. Sol*, vol. 13, pp. 141–146.
- △ Wei J., Lin Y., Li Y., Ying C., Chen J., Song L., Zhou Z., Lv Z., Xia W., Chen X., Xu S., (2011), Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet, *Endocrinology*,

vol. 152, pp. 3049–3061.

- △ West R.J., Goodwin P.A., Klecka G.M., (2001), Assessment of the ready biodegradability of Bisphenol A, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 67, pp. 106-112.
- △ Yamada H., (2002), Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester, *Reprod Toxicol*, vol. 16, pp. 735-739.
- △ Yan S., Chen Y., Dong M., Song W., Belcher S.M., Wang H.S., (2011), Bisphenol A and 17 β -estradiol promote arrhythmia in the female heart via alteration of calcium handling, vol. 6, issue 9, pp.425-455, *PLoS ONE*, www.plosone.org.
- △ Ye X., Bishop A.M., Reidy J.A., Needham L.L., Calafat A.M., (2007), Temporal stability of the conjugated species of bisphenol A, parabens, and other environmental phenols in human urine, *J Exp Sci Environ Epidemiol.*, vol. 17, pp. 567–572.
- △ Yoon Y., Westerhoff P., Snyder S.A., Esparza M., (2003), HPLC-fluorescence detection and adsorption of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynyl estradiol on powdered activated carbon, *Water Res.*, vol. 37, pp. 3530-3537.
- △ Zalko D., Jacques C., Duplan H., Bruel S., Perdu E., (2011), Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A. *Chemosphere*, vol. 82 (3), pp. 424-430.
- △ Zeng G., Zhang C., Huang G., Yu J., Wang Q., Li J., Xi B., Liu H., (2006), Adsorption behavior of bisphenol-A on sediments in Xiangjiang River, Central-south China, *Chemosphere*, vol. 65, pp. 1490-1499.
- △ Zs-Nagy I., Steiber J., Jeney F. (1995), Induction of age pigment accumulation in the brain cells of young male rats through ironinjection into the cerebrospinal fluid, *Gerontology*, vol. 41 (Suppl. 2), pp. 145–158.

Siti consultati

- ⤴ <http://www.arpa.emr.it>
- ⤴ <http://www.europass.parma.it>
- ⤴ <http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/bisphenol.html>
- ⤴ http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/foodcontact/legisl_list_en.html
- ⤴ <http://www.geoc.ubc.ca/biodiversity/efauna/EarthwormsIntroduction.html>
- ⤴ http://www.minambiente.it/home_it/menu.html
- ⤴ <http://www.iss.it> istituto superiore di sanità
- ⤴ www.anses.fr French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety
- ⤴ <http://ec.europa.eu/dgs/jrc/> european joint research centre
- ⤴ <http://www.nih.gov/>
- ⤴ <http://www.fda.gov>
- ⤴ <http://www.epa.gov/>
- ⤴ <http://www.foodstandards.gov.au>
- ⤴ <http://www.endocrinedisruption.com/endocrine.bisphenol.overview>
- ⤴ <http://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-bpa/>
- ⤴ <http://www.who.int/>