

UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

Regolazione dell'attività dei trasportatori MXR nel mitilo
(*Mytilus galloprovincialis*)

Tesi di laurea in Adattamento degli animali all'ambiente marino

Relatore

Prof.ssa Elena Fabbri

Correlatore

Dott.ssa Silvia Franzellitti

Presentata da

Teresa Striano

III sessione

Anno Accademico 2013/2014

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 CONTAMINAZIONE AMBIENTALE DA FARMACI.....	1
1.1.1 PROPRANOLOLO.....	5
1.1.2 CARBAMAZEPINA	7
1.1.3 FLUOXETINA	9
1.2 MULTIXENOBIOTIC RESISTANCE (MXR)	10
1.2.1 P-GLICOPROTEINA (Pgp).....	11
1.2.2 MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN (MRP)	13
1.3 SPECIE TARGET DELLO STUDIO: <i>Mytilus galloprovincialis</i>	14
2. SCOPO DELLA TESI	17
3. METODI SPERIMENTALI.....	19
3.1 MANTENIMENTO DEGLI ANIMALI	19
3.2 ESPERIMENTI <i>IN VITRO</i>	19
3.3 ATTIVITA' DI TRASPORTO	19
3.3.1 PREPARAZIONE DI UNA COLTURA PRIMARIA DI EMOCITI DI MITILO	19
3.3.2 TRATTAMENTO <i>IN VITRO</i> DEGLI EMOCITI.....	20
3.3.3 PREPARAZIONE E TRATTAMENTO DI BIOPSIE DI BRANCHE	23
3.4 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' DI TRASPORTO	23
3.5 VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI PRODOTTI GENICI <i>ABCB</i> E <i>ABCC</i> DI MITILO	24
3.5.1 ESTRAZIONE RNA.....	24
3.5.2 RETROTRASCRIZIONE.....	25
3.5.3 PCR <i>REAL TIME</i>	25
3.3.5 SAGGIO DI CITOTOSSICITA'	32
3.5 ANALISI STATISTICA	33
4. RISULTATI	34
4.1 ATTIVITA' BASALE IN PRESENZA DI INIBITORI MODELLO	34
4.2 ESPRESSIONE BASALE DEI PRODOTTI GENICI <i>ABCB</i> E <i>ABCC</i>	37
4.3 MODULAZIONE DELL'ATTIVITA' DI TRASPORTO IN EMOCITI TRATTATI CON I FARMACI	38

4.4 ESPRESSIONE DEI PODOTTI GENICI <i>ABCB</i> E <i>ABCC</i> IN EMOCITI DI MITILO TRATTATI CON I FARMACI	41
4.5 SAGGIO DI CITOTOSSICITA'	43
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	46
5.1 TRATTAMENTO CON INIBITORI MODELLO	46
5.2 TRATTAMENTO CON FARMACI	48
REFERENZE BIBLIOGRAFICHE.....	52

1. INTRODUZIONE

1.1 CONTAMINAZIONE AMBIENTALE DA FARMACI

Nella metà degli anni '90, la scoperta di tecniche analitiche volte all'individuazione degli inquinanti in ambiente ha sollevato il problema della presenza, in esso, di farmaci. I farmaci sono una classe di xenobiotici appartenenti al gruppo dei contaminanti emergenti, sostanze che rappresentano una potenziale minaccia per la salvaguardia dell'ecosistema e della salute umana (Santos *et al.*, 2010). In ambiente sono stati ritrovati numerosi farmaci utilizzati nella medicina umana e veterinaria tra cui soprattutto antiinfiammatori (ibuprofene e diclofenac), antibiotici (macrolidi e cefalosporine), medicinali per la regolazione del colesterolo e dei lipidi (colifibrati e statine), β -bloccanti (propranololo), farmaci neuroattivi (caffaina, carbamazepina, fluoxetina e morfina), e molti altri (Santos *et al.*, 2010; Fent *et al.*, 2006).

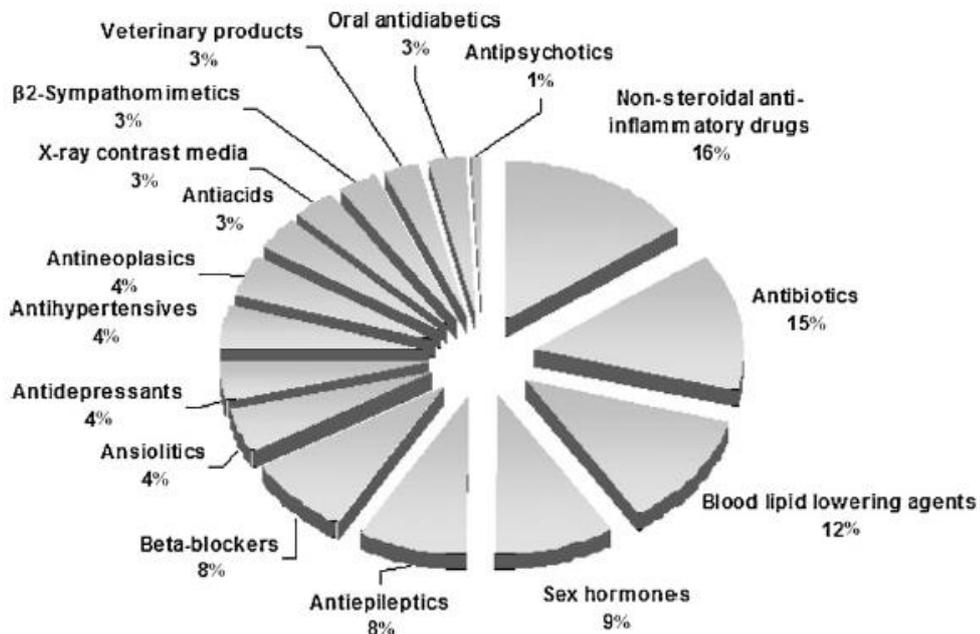


Figura 1.1. Classi di farmaci rilevati in ambiente, espressi in percentuale. I dati sono raccolti da 134 articoli pubblicati tra il 1997 e il 2009 (Santos *et al.*, 2010).

Tali composti entrano nell'ambiente acquatico, nella loro forma nativa o come metaboliti, in vari modi. La principale fonte di inquinamento da farmaci è rappresentata dai pazienti sottoposti a cure mediche, in quanto parte del principio attivo del farmaco viene assorbito ed ha effetto

terapeutico, e parte viene escreto nelle acque di scarico, sia domestiche che ospedaliere. Un'altra fonte è rappresentata dai processi di smaltimento dei liquami derivati da allevamenti e da impianti di acquacoltura, in cui l'utilizzo di farmaci veterinari è molto elevato, poi vi sono fenomeni di smaltimento illecito dei medicinali nell'ambiente e l'utilizzo dei fanghi di depurazione in agricoltura per il recupero dei nutrienti inorganici; tutti contribuiscono in varia misura alla presenza di tali inquinanti nelle acque di scarico. Queste ultime, con i contaminanti in esse contenuti, vengono poi convogliate agli impianti di depurazione, i quali, tuttavia, non rimuovono completamente i composti terapeutici, determinando la loro presenza nei fiumi, laghi, falde acquifere e ambienti marini. Gli impianti di depurazione hanno, infatti, un'efficienza di eliminazione dei farmaci che varia tra lo 0 % e il 99% (Ternes, 1998; Carballa *et al.*, 2004), variazione dovuta alla tecnologia del trattamento, al tempo di ritenzione idrica, alla stagione e alla performance del depuratore (Fent *et al.*, 2006), caratteristiche che rendono variabili anche i tassi di rimozione di ogni singolo composto tra i differenti depuratori. Bisogna, inoltre, sottolineare che non tutte le regioni o i paesi del mondo possiedono strutture di depurazione delle acque reflue, aumentando così le problematiche ambientali.

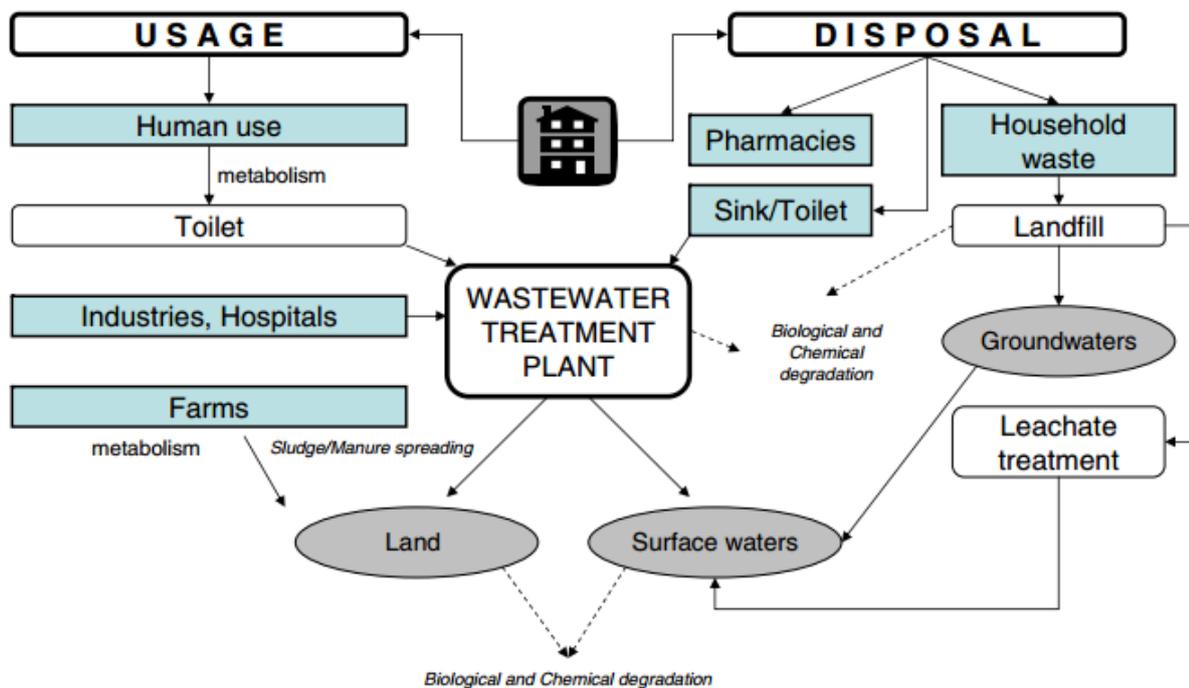


Figura 1.2. Fonti e destino dei farmaci in ambiente (Nikolaou *et al.*, 2007)

Il comportamento e il destino dei farmaci e dei loro metaboliti nell'ambiente acquatico non è ancora del tutto compreso. A ragione di ciò, recenti studi si sono focalizzati sulla distribuzione e persistenza nell'ambiente dei prodotti farmaceutici (Nikolaou *et al.*, 2007) e sugli effetti di questi sugli organismi acquatici (Martin-Diaz *et al.*, 2009; Mennigen *et al.*, 2011), in modo tale da aumentare le conoscenze a riguardo.

La distribuzione dei farmaci in ambiente avviene principalmente attraverso il trasporto acquatico, anche se il contributo della catena alimentare non è da trascurare (Fent *et al.*, 2006), e il loro tasso di persistenza varia a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche proprie di ciascun composto, le quali incidono sui processi di degradazione. La degradazione dei prodotti farmaceutici nelle acque superficiali avviene mediante il processo di fotolisi, sia diretta, per cui la radiazione luminosa viene direttamente assorbita dal composto, che indiretta, coinvolgendo composti fotosensibilizzatori, quali nitrati e acidi umici, implicati nel trasferimento dell'energia luminosa. Nonostante molti farmaci subiscano processi di trasformazione, essendo introdotti in modo continuo nell'ecosistema con una velocità maggiore di quanto si degradino risultano pseudo-persistenti, portando gli organismi acquatici ad esservi esposti per tutta la loro vita.

I composti terapeutici, molecole biologicamente attive anche a basse concentrazioni, disegnate per interagire con specifici bersagli, possono agire, su vertebrati e invertebrati acquatici, con la stessa modalità d'azione che presentano negli esseri umani, se nei tessuti della fauna acquatica trovano gli stessi target molecolari. Tuttavia, alcuni recettori, negli organismi acquatici, hanno differenti funzionalità rispetto a quelli degli umani o sono totalmente mancanti, rendendo il compito di prevedere l'eventuale effetto tossico degli inquinanti su tali organismi molto impegnativo.

Studi ecotossicologici hanno stimato che le basse concentrazioni di farmaci presenti in ambiente, comprese tra ng/L e µg/L, non rappresentano un rischio per l'ecosistema. Tuttavia, vi sono evidenze dell'effetto negativo dei farmaci sugli organismi acquatici, anche a concentrazioni ambientali, come riportato da Santos *et al.* (2010) e da Mimeault *et al.* (2005). Questi, infatti, hanno ritrovato, rispettivamente, la presenza di pesci con gonadi sia maschili che femminili e alti livelli di vitellogenina in conseguenza alla femminilizzazione dei pesci maschi, dovuti all'ormone 17 α -etinilestradiolo; e un abbassamento del livello del testosterone in pesci maschi, determinato dall'azione del gemfibrozil.

Le conoscenze acquisite sulla contaminazione ambientale da farmaci hanno portato all'emanazione di direttive volte a limitare i potenziali rischi ambientali provocati da questi. La

prima Direttiva introdotta dall'Unione Europea, la Direttiva 92/18/EEC, ha imposto una valutazione del rischio ambientale causato dai farmaci ad uso veterinario, come requisito per ottenere l'autorizzazione alla loro vendita. A tal proposito l'European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA) ha stabilito delle linee guida volte a valutare il rischio ambientale dei prodotti farmaceutici ad uso veterinario. Tale concetto è stato poi esteso ai farmaci per uso umano con la Direttiva 2001/83/EC, modificata più volte, e definitivamente nel 2006. Tale direttiva divide in due fasi la valutazione dell'impatto ambientale, sia per i farmaci ad uso veterinario che umano.

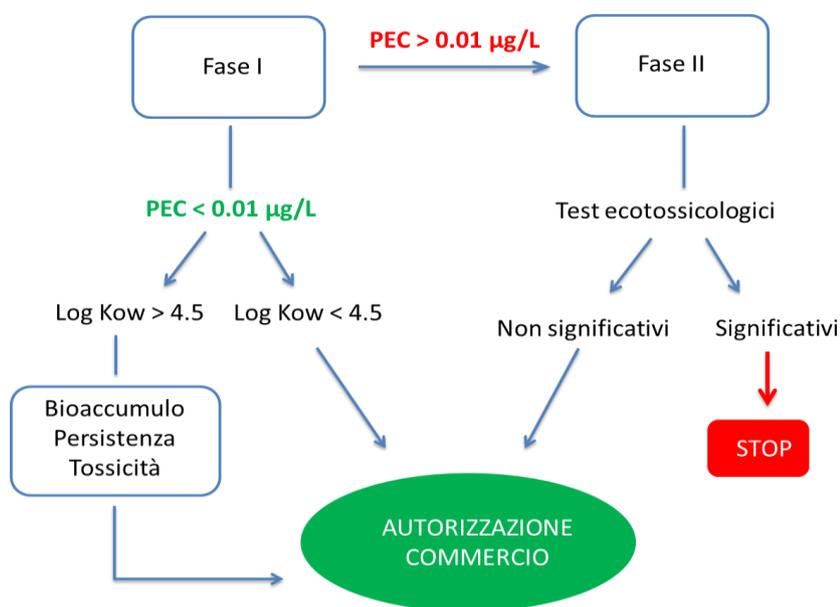


Figura 1.3. Linee guida EMA per la valutazione del rischio ambientale dovuto alla contaminazione da farmaci

La prima fase è volta a determinare le concentrazioni ambientali dei farmaci e dei loro metaboliti, valutando il PEC (Predicted Environmental Concentration). Se il PEC è superiore a 0.01 µg/L, il farmaco viene sottoposto alla seconda fase imposta dalla direttiva, caratterizzata dalla valutazione del destino e degli effetti dei composti farmaceutici mediante test ecotossicologici su specie bioindicatrici secondo appositi protocolli definiti dall'Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) e dall'International Organization for Standardization (ISO). A queste procedure si aggiungono le raccomandazioni dell'Oslo and Paris Commission (OSPAR), la quale decreta che molecole farmaceutiche con coefficiente di

ripartizione (Log Kow) maggiore a 4.5 devono essere considerate potenzialmente pericolose per l'ecosistema; su tali composti ulteriori esperimenti di bioaccumulo, persistenza e tossicità dovrebbero essere dunque effettuati, anche se la normativa non prevede in questo caso il ritiro dal commercio del farmaco.

Nonostante l'emanazione di tali Direttive, vi sono ancora delle lacune nella legislazione riguardante la contaminazione ambientale da farmaci, per questo, recentemente, è stato sviluppato un modello concettuale definito "mode of action" (MOA), costituito da tre fasi:

- Identificazione del meccanismo di un determinato composto
- Omologia del bersaglio dei farmaci nell'uomo e negli organismi in ambiente.
- Identificazione del meccanismo fisiologico alterato dall'azione del composto esaminato.

Da tutto ciò si deduce che le ricerche condotte nei laboratori scientifici sono essenziali per fornire informazioni necessarie alla definizione di normative in materia di contaminazione ambientale da farmaceutici.

Tra i farmaci più comuni ritrovati in ambiente annoveriamo il propranololo, la carbamazepina e la fluoxetina.

1.1.1 PROPRANOLOLO

Il propranololo, antagonista non specifico dei recettori β -adrenergici, è stato il primo farmaco β -bloccante utilizzato nel trattamento dell'ipertensione arteriosa, delle aritmie e di altre patologie cardiache.

Nei mammiferi vi sono due tipi di recettori adrenergici (AR), α e β , e di questi è dimostrata l'esistenza di diversi sottotipi: α_1 (sottotipi A, B e D); α_2 (sottotipi A, B, e C); β_1 , β_2 e β_3 .

I recettori adrenergici, sono proteine aventi un dominio extracellulare N-terminale, uno intracellulare C-terminale e sette domini transmembrana accoppiati a proteine G, sia stimolatorie (G_s) che inibitorie (G_i). Le proteine G inattive sono costituite da tre subunità, una subunità α , con annessa molecola di GDP, una subunità β e una γ . Il legame di specifici ligandi, quali le catecolamine, con i recettori adrenergici, attiva differenti casate di trasduzione del segnale, aumentando o diminuendo i livelli di cAMP intracellulari, a seconda se i recettori sono,

rispettivamente, accoppiati a proteine G_s o G_i . Nello specifico, il legame delle catecolamine con i recettori adrenergici induce un cambiamento conformazionale del recettore, favorendo la conversione di GDP, adeso alla subunità α della proteina G, in GTP. A seguito di questa conversione il complesso G_α -GTP si dissocia dalle altre due subunità della proteina G, e, se il recettore è accoppiato ad una proteina G_s , il complesso G_α -GTP va ad attivare l'enzima adenilato ciclasi il quale converte l'adenosin trifosfato (ATP) in adenosina monofosfato ciclico (cAMP), la quale, a sua volta, attiva la proteina chinasi A (PKA), promuovendo la risposta cellulare; nel caso in cui il recettore è accoppiato a proteine G_i il complesso G_α -GTP inibisce l'enzima adenilato ciclasi bloccando la trasduzione del segnale.

I recettori β -adrenergici sono accoppiati a proteine G_s , così come i recettori α_1 , mentre i recettori α_2 -adrenergici sono accoppiati alla proteina G_i .

Il propranololo, essendo un β -bloccante, si lega ai recettori β -adrenergici, bloccando la cascata di traduzione del segnale e determinando una diminuzione dei livelli di cAMP intracellulari.

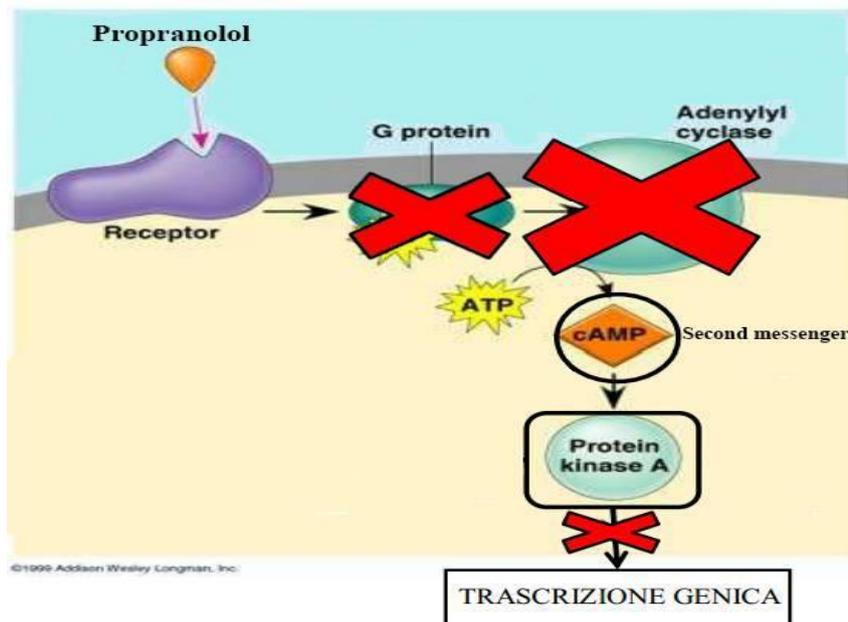


Figura 1.4. Meccanismo d'azione del propranololo.

I vertebrati e gli invertebrati presentano un sistema adrenergico ben conservato, con elevata similarità tra i recettori, portandoci a presupporre che i β -bloccanti possano agire, negli organismi acquatici, in modo analogo ai mammiferi. Basandosi su tale ipotesi, diverse analisi

sono state focalizzate sugli effetti negativi del propranololo su vertebrati e invertebrati acquatici. Studi riguardanti l'effetto del propranololo su un pesce d'acqua dolce e salmastra, *Oryzias latipes*, hanno dimostrato che tale farmaco riduce il tasso di crescita, abbassa i livelli plasmatici di steroidi e favorisce la diminuzione della produzione delle uova in tale organismo (Huggett *et al.* 2002). Negli invertebrati, invece, recenti studi (Dzialowski *et al.*, 2006) hanno dimostrato che un'esposizione cronica al propranololo decrementa il tasso di contrazione del cuore, il tasso di crescita e di riproduzione in organismi di *Daphnia magna*.

Il propranololo nei mammiferi esplica non solo l'azione β -bloccante ma anche una da antagonista dei recettori della serotonina. Recenti studi (Franzellitti *et al.*, 2011) hanno dimostrato la presenza di questa azione secondaria del propranololo anche negli invertebrati appartenenti alla specie *Mytilus galloprovincialis*, a ragione del fatto che il sistema serotoninergico, così come quello adrenergico, è ben conservato. I recettori della serotonina presenti nei mitili appartengono alla famiglia 5-HT₁, recettore accoppiato a proteine G_i. Il propranololo, agendo da antagonista per questo recettore determina l'eliminazione dell'autoinibizione dei recettori causata dal legame con la serotonina, aumentando i livelli intracellulari di cAMP.

Il propranololo è un composto lipofilo che presenta un alto log K_{ow} (Fent *et al.*, 2006), caratteristica che lo rende molto affine alle membrane biologiche, favorendo il suo bioaccumulo nei tessuti. Inoltre l'intenso utilizzo del propranololo e la sua limitata rimozione negli impianti di depurazione fanno sì che esso sia presente in ambiente in concentrazioni molto elevate, comprese tra 1.9 $\mu\text{g/L}$ e 0.59 $\mu\text{g/L}$ (Owen *et al.*, 2007), concentrazioni sufficienti ad interferire negativamente con gli organismi acquatici.

1.1.2 CARBAMAZEPINA

La carbamazepina è un anticonvulsivo e stabilizzatore dell'umore, utilizzato comunemente per il trattamento dell'epilessia, per i disturbi maniaco depressivi e per le nevralgie del trigemino.

Le proprietà anticonvulsive della carbamazepina sono attribuite alla sua azione di inibitore dei canali voltaggio-dipendenti del sodio, presenti in neuroni eccitatori. La modalità d'azione di questo farmaco non è ancora ben conosciuta, si ipotizza, comunque, che la carbamazepina riduca la scarica ripetitiva ad alta frequenza dei potenziali d'azione presinaptici, bloccando i canali del sodio nel loro stadio inattivo. La mancata depolarizzazione della membrana presinaptica non

permette l'apertura dei canali voltaggio-dipendenti del Ca^{2+} , impedendo così l'esocitosi dei neurotrasmettitori nella fessura sinaptica.

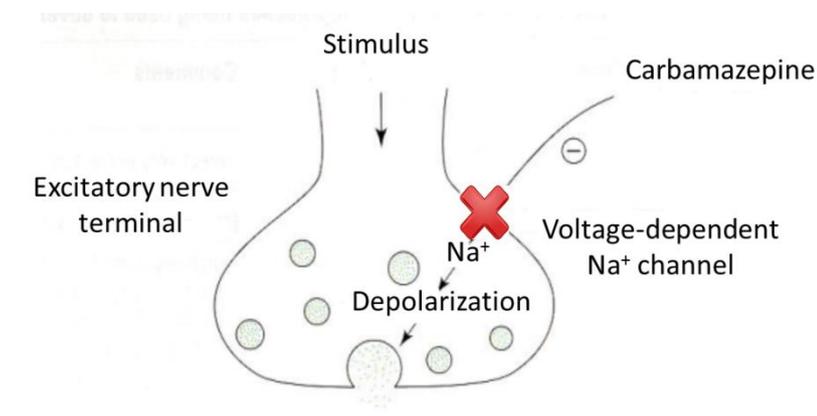


Figura 1.5. Meccanismo d'azione della carbamazepina

Gli effetti terapeutici della carbamazepina sono parzialmente dovuti all'alterazione dei livelli di cAMP intracellulari. Studi volti a definire gli effetti di questo farmaco sugli organismi di *Mytilus galloprovincialis* (Martin-Diaz *et al.*, 2009) confermano tale affermazione, sebbene, ancora non è chiaro il meccanismo che vi è alla base.

A causa del basso tasso di rimozione nei depuratori (circa 10%) ed alla bassa biodegradabilità della carbamazepina, questa si presenta in ambiente acquatico in concentrazioni molto elevate. Questo farmaco è stato, infatti, ritrovato a concentrazioni di 6.3 $\mu\text{g/L}$ nelle acque reflue, negli effluenti in concentrazioni medie di 2.3 $\mu\text{g/L}$ e in un range tra 0.1 e 1 $\mu\text{g/L}$ nelle acque superficiali (Fent *et al.*, 2006).

La tossicità acuta della carbamazepina viene esplicita a concentrazioni nell'ordine di mg/L, come dimostrato da studi condotti in organismi del genere *Daphnia* o in moscerini, i quali presentano effetti tossici relativi alla carbamazepina quando esposti, rispettivamente, a concentrazioni pari a 17.2 mg/L e a 34.4 mg/L (Thaker, 2005), concentrazioni molto al di sopra del range ambientale. Tuttavia la carbamazepina, a concentrazioni ambientali, in organismi di *Daphnia pulex* causa una tendenza precoce alla maturazione e alla riproduzione, suggerendo un effetto stimolatorio del farmaco (Lüring *et al.*, 2006), mentre in *Oncorhynchus mykiss* porta a cambiamenti strutturali nel fegato e nelle branchie (Triebkorn *et al.*, 2007). Nei mitili, in particolare, tale farmaco induce stress ossidativo riducendo la stabilità delle membrane

lisosomiali, aumentando la produzione di malondialdeide e l'accumulo di lipofuscine (indici di stress ossidativo) e, infine, stimolando l'attività degli enzimi antiossidanti (Martin-Diaz *et al.*, 2009).

1.1.3 FLUOXETINA

La fluoxetina è il principio attivo del Prozac, un antidepressivo ampiamente utilizzato per il trattamento della depressione, dei disturbi ossessivi compulsivi e alimentari.

La fluoxetina agisce sul sistema nervoso centrale inibendo selettivamente una proteina carrier presente nella membrana pre-sinaptica responsabile del re-uptake della serotonina. Questa inibizione produce un aumento della concentrazione della serotonina nella fessura sinaptica, favorendo l'interazione del neurotrasmettitore con i recettori post-sinaptici.

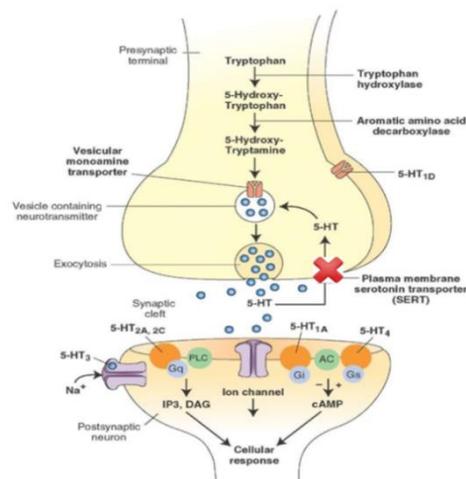


Figura 1.6. Meccanismo d'azione della fluoxetina.

La serotonina, neurotrasmettitore implicato in importanti meccanismi ormonali e neurali, esplica i suoi effetti legandosi a molteplici recettori di membrana presenti nel sistema nervoso, come anche in quello sanguigno, gastro-intestinale, endocrino, sensoriale e cardiovascolare (Hoyer *et al.*, 2002). La classificazione attuale descrive nei mammiferi, sette famiglie di recettori serotoninergici, 5-HT1, 5-HT2, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5, 5-HT6, 5-HT7, proteine di membrana monomeriche a sette domini transmembrana accoppiate a proteine G (Hannon e Hoyer, 2008). I

recettori serotoninergici, sono per lo più accoppiati a proteine G_s , fatta eccezione per i recettori 5-HT1 e 5-HT5, accoppiati a proteine G_i e per il recettore 5-HT3, il quale è un canale ionico per il Na^+ e K^+ (Hoyer *et al.*, 2002).

I trasportatori per la serotonina sono stati ritrovati in tutte le classi di vertebrati e invertebrati, anche se in quest'ultimi la classificazione molecolare e farmacologica di tali recettori non è, ancora, ben sconosciuta (Fabbri e Capuzzo, 2010). Si hanno, comunque, certezze sulla presenza del recettore 5-HT1 nei molluschi (Tierney, 2001), recettore strutturalmente omologo al recettore 5-HT1 presente nei mammiferi, ma funzionalmente differente, presentando un profilo misto tra il recettore 5-HT1 e quello 5-HT2 (Tierney, 2001).

La fluoxetina si presenta come un distruttore neuroendocrino sia nei mammiferi che nei vertebrati e invertebrati acquatici, in quanto, incrementando i livelli di serotonina nello spazio sinaptico, porta ad alterazioni delle funzioni dei recettori serotoninergici. Alterazioni sono state ritrovate nella produzione di uova nel *Danio rerio* (Lister *et al.*, 2009), nelle concentrazioni intracellulari di estradiolo in *Oryzas latipes* (Foran *et al.*, 2004) e nei livelli di vitellogenina in organismi di *Pimephales promelas* (Schultz *et al.*, 2011). La fluoxetina a concentrazioni ambientali è in grado di influenzare negativamente anche gli invertebrati acquatici inducendo, il movimento rotazionale della ciglia negli embrioni di gasteropodi (Uhler *et al.*, 2000), la loro metamorfosi larvale (Cooper e Leise, 1996) e processi riproduttivi, compresa la deposizione delle uova e la maturazione degli oociti in *Dreissena polymorpha* (Fong, 1998).

Complessivamente, i composti inibitori del reuptake della serotonina si presentano nel compartimento acquatico in concentrazioni nell'ordine dei ng/L. In particolare la fluoxetina si presenta negli effluenti in concentrazioni comprese tra 0.4-18.7 ng/L e negli effluenti in un range di 0.12-8.4 ng/L (Vasskog *et al.*, 2006; Lajeunesse *et al.*, 2008).

1.2 MULTIXENOBIOTIC RESISTANCE (MXR)

È ormai nota la presenza in molti organismi acquatici di un meccanismo di resistenza agli xenobiotici (MXR) funzionalmente correlato al Multidrug Resistance (MDR), proprio dei mammiferi. Juliano e Ling (1976) hanno descritto il meccanismo MDR, per la prima volta osservato in una linea di cellule tumorali di mammifero, come il risultato di uno scarso accumulo cellulare di farmaci antineoplastici, dovuto alla sovra espressione di una proteina transmembrana ATP-dipendente, responsabile dell'efflusso del farmaco nello spazio extracellulare.

Successivamente alla scoperta di tale proteina, denominata Permeability glycoprotein (Pgp), numerose altre proteine coinvolte nel meccanismo MDR, quali le Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP) e la Breast Cancer Resistance Protein (BCRP), tutte appartenenti alla superfamiglia ABC, come la stessa Pgp, sono state ritrovate essere coinvolte nell'impedimento dell'accumulo cellulare dei farmaci, limitando l'azione di questi e, dunque, la risposta del paziente alla chemioterapia.

Recenti studi effettuati sui mammiferi, hanno però dimostrato la presenza di Pgp e di MRP anche in membrane cellulari di tessuti non cancerosi, portandoci a dedurre che tali proteine hanno anche un ruolo fisiologico, proteggendo la cellula dall'accumulo di xenobiotici potenzialmente tossici per l'organismo.

L'esistenza di proteine Pgp-like e MRP-like in molti organismi acquatici quali spugne, echinodermi (Kurelec *et al.*, 1992) e bivalvi (Cornwall *et al.*, 1995), ci suggerisce che essi presentano un meccanismo di detossificazione cellulare, il meccanismo MXR. Tale sistema di protezione è essenziale negli organismi acquatici continuamente esposti ad una moltitudine di inquinanti sia naturali che antropogenici.

Alcuni composti chimici possono però alterare la funzione del meccanismo MXR, incrementando la concentrazione intracellulare di composti tossici e, pertanto, compromettendo la vitalità dell'organismo.

1.2.1 P-GLICOPROTEINA (Pgp)

Negli esseri umani la Permeability glycoprotein (Pgp) è localizzata nella superficie apicale delle cellule epiteliali di tessuti implicati nell'assorbimento e nella secrezione, quali la placenta, la barriera emato-encefalica, il fegato, il rene e le viscere (Leslie *et al.*, 2005). Pgp è una proteina di 170-180 kDa costituita da circa 1280 amminoacidi codificata dal prodotto genico *ABCB*, il quale, come recenti studi dimostrano (Franzellitti e Fabbri, 2013) è sotto il controllo di cAMP/PKA.

Questa proteina transmembrana è organizzata in 4 domini, due citoplasmatici (NDB), e due transmembrana (MSD). I domini citoplasmatici sono costituiti da tre sequenze amminoacidiche ben conservate, la sequenza Walker A, la quale presenta un residuo di lisina coinvolto nel legame del β -fosfato dell'ATP, la sequenza Walker B che possiede un residuo di acido aspartico che interagisce con il Mg^{2+} , e infine tra queste due sequenze ve ne è una terza, definita sequenza

C, implicata nel legame e nell'idrolisi dell'ATP. I domini transmembrana sono, invece, costituiti da 6 α -eliche ognuno e sono implicati nel passaggio delle sostanze attraverso la membrana cellulare.

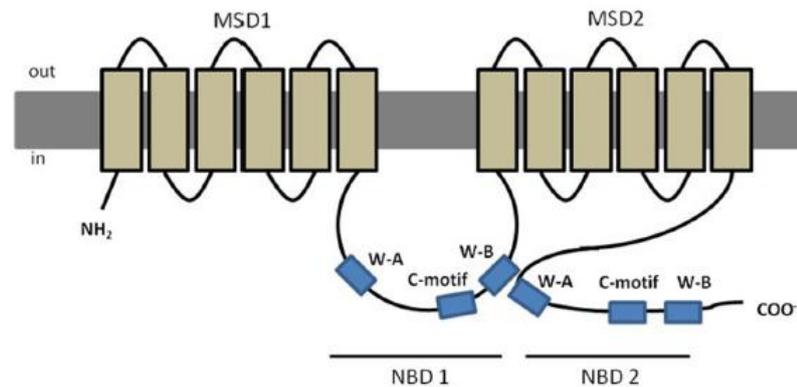


Figura 1.7. Struttura della proteina transmembrana Pgp

Il meccanismo coinvolto nel trasporto dei substrati all'esterno della cellula, mediante l'azione della P-glicoproteina, non è ancora ben chiaro. Le conoscenze possedute a riguardo ci permettono di affermare che la proteina in esame, nel suo stato conformazionale basale, presenta i domini citoplasmatici privi di ATP e i siti di legame per i substrati, presenti nei domini transmembrana, rivolti verso il lato citoplasmatico. Il legame di ATP alla sequenza C di uno dei domini citoplasmatici del trasportatore favorisce un'associazione tra tale sequenza e quella Walker A del secondo dominio citoplasmatico determinando la formazione di una configurazione definita a sandwich. Dati biochimici dimostrano che tale associazione porta ad un aumento dell'affinità dei domini transmembrana del recettore per i substrati intracellulari, favorendo la loro congiunzione. In seguito l'ATP viene idrolizzato ad ADP + P_i, reazione che a sua volta determina un cambiamento conformazionale dei domini transmembrana, i quali rivolgono il sito di legame per i substrati verso il lato extracellulare. In questa conformazione il recettore perde affinità per il substrato e si ha il rilascio del composto. La successiva dissociazione di P_i e ADP dal recettore fa sì che il trasportatore torni nella sua conformazione basale.

Attraverso il meccanismo sopra descritto Pgp trasporta un'ampia varietà di composti, tutti moderatamente idrofobici, anfipatici, piccoli composti neutrali o positivamente caricati, prodotti naturali, steroidi e farmaci chemioterapeutici (Litman *et al.*, 2001; Higgins, 2007).

1.2.2 MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN (MRP)

Le Multidrug Resistance-Associated Protein (MRP) sono delle proteine di membrana di 190 kDa contenenti 1531 amminoacidi. Questa subfamiglia presenta in totale 13 membri, molti dei quali sono trasportatori di membrana ATP-dipendenti per anioni organici di composti terapeutici. È stato dimostrato che tra questi membri, solo cinque sono coinvolti nel meccanismo MDR e di questi MRP2 risulta essere il membro maggiormente coinvolto nel meccanismo MXR degli organismi acquatici.

MRP2 è costituito da 5 domini, tre transmembrana (MSD) e due citoplasmatici (NBD). Il dominio transmembrana N-terminale, il quale svolge un ruolo nell'affinità degli anioni organici con il recettore, presenta l' NH_2 terminale extracitosolica e 5 α -eliche, mentre i rimanenti MSD presentano 6 α -eliche. I domini citoplasmatici presentano invece la stessa conformazione e disposizione ritrovate in Pgp.

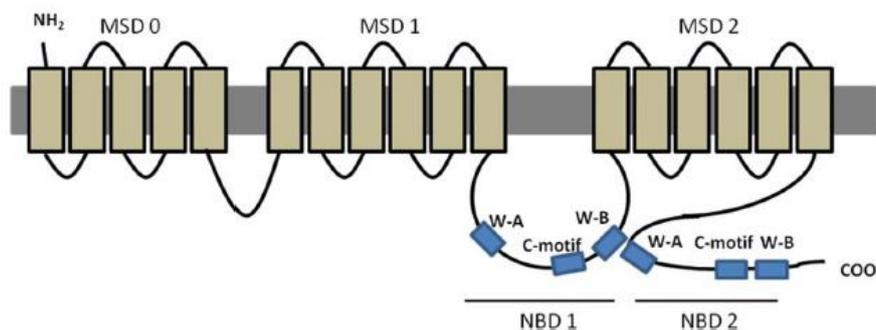


Figura 1.8. Struttura della proteina transmembrana MRP2.

MRP2, codificata dal prodotto genico *ABCC*, è una proteina di membrana ATP-dipendente che trasporta xenobiotici all'esterno della cellula attraverso un meccanismo di cotrasporto. Infatti, il trasporto di sostanze da parte di MRP2 può avvenire solo in concomitanza dell'efflusso di glutatione e dell'idrolisi di ATP, anche se, come il trasporto mediato da MRP2 sia correlato al

legame e all'idrolisi di ATP ancora non è chiaro. Attraverso questo cotrasporto si ha l'efflusso di glucuronidi, anioni organici, bilirubina e metaboliti dell'estradiolo (Jedlitschky *et al.*, 1996).

1.3 SPECIE TARGET DELLO STUDIO: *Mytilus galloprovincialis*

Il *Mytilus galloprovincialis* è un mollusco appartenente alla classe Bivalvia, animali acquatici che vivono adesi a substrati duri dell'intertidale, zona caratterizzata da continue variazioni dei parametri chimico-fisici ambientali.

Regno: Animalia

Ramo: Bilateria

Phylum: Mollusca

Subphylum: Conchifera

Classe: Bivalvia

Ordine: Mytiloidea

Famiglia: Mytilidae

Genere: *Mytilus*

Specie: *Mytilus galloprovincialis*

Il corpo dei Bivalvi è a simmetria bilaterale, compresso lateralmente e racchiuso in una conchiglia. Quest'ultima è formata da due valve calcaree, solitamente convesse, congiunte da una cerniera e da un legamento della cerniera posto dorsalmente. Da una valva all'altra si estendono due muscoli adduttori trasversali, uno anteriore e uno posteriore, composti da una combinazione di fibre muscolari lisce di aspetto madreperlaceo e striate d'aspetto vitreo. Il muscolo liscio fornisce contrazioni lente e a basso consumo energetico, mentre i muscoli striati danno luogo a contrazioni rapide ad alto consumo energetico. I legamenti della cerniera e i muscoli adduttori compiono movimenti antagonisti e cooperano per aprire e chiudere le valve. Tale meccanismo di apertura e chiusura della conchiglia permette all'animale di evitare l'essiccamento durante le fasi di bassa marea, chiudendo in maniera ermetica le valve, e di

favorire l'alimentazione, l'escrezione e l'osmoregolazione, aprendole. Internamente le valve sono ricoperte dal mantello, struttura costituita da un tessuto molle che svolge un ruolo fondamentale nella sopravvivenza dell'organismo, in quanto è responsabile dell'accumulo delle sostanze di riserva, dello sviluppo delle gonadi e del rivestimento della massa viscerale. In posizione medio ventrale rispetto alla massa viscerale sporge un piede ridotto, alla cui base si apre la ghiandola bissogena, responsabile della formazione del bisso, struttura costituita da numerosi filamenti a base di amminoacidi, coinvolta nell'adesione degli organismi ai substrati duri. L'ano dei bivalvi si apre al di sotto del muscolo adduttore posteriore, mentre la bocca, fenditura trasversale provvista di due paia di tentacoli labiali, è posta in posizione subterminale.



Figura 1.9. Anatomia *Mytilus galloprovincialis*.

I bivalvi sono organismi filtratori, specializzati nell'assunzione di particelle di piccole dimensioni. La filtrazione avviene per mezzo delle branchie, strutture deputate sia alla nutrizione che agli scambi gassosi. Queste strutture sono formate da un asse di sostegno, al cui interno decorrono vasi sanguigni sia afferenti che efferenti, e da filamenti branchiali, posizionati lateralmente al sostegno e rivestiti da un epitelio cigliato sulla faccia esterna. Il movimento di queste ciglia genera una corrente d'acqua che entra nell'organismo da un sifone inalante e si dirige verso la parte ventrale della cavità del mantello, in prossimità delle branchie, dove le particelle alimentari e le sostanze gassose trasportate vengono trattenute.

Le particelle alimentari agglutinate all'interno di un cordone mucoso penetrano nella bocca e vengono convogliate attraverso un breve esofago cigliato allo stomaco. Quest'ultimo presenta un lungo diverticolo cieco contenente lo stilo del cristallino, struttura poggiate su uno scudo

gastrico. Il movimento rotatorio dello stilo sullo scudo gastrico, fa sì che esso si consumi per sfregamento, liberando nello stomaco gli enzimi in esso contenuti. Successivamente le particelle alimentari vengono convogliate verso l'intestino, il quale si prolunga posteriormente verso il retto che attraversando il pericardio e il ventricolo sbocca nell'ano.

Le sostanze gassose filtrate dalle branchie vengono, invece, assimilate dall'emolinfa che decorre nei vasi presenti nell'asse di sostegno delle branchie e vengono trasportate in tutto il corpo dell'animale grazie al sistema circolatorio aperto di questi organismi. I molluschi bivalvi presentano un cuore formato da un ventricolo e due atri, aorte che conducono l'emolinfa ai seni sanguigni emocelici, e vene, attraverso le quali questa refluisce al cuore. L'emolinfa presente nei seni sanguigni, attraverso l'emocele, si porta alle branchie, dove viene ossigenata, per ritornare al ventricolo attraverso gli atri. Nel pericardio in corrispondenza degli atri si presentano delle ghiandole che favoriscono il primo processo di filtrazione dell'emolinfa. L'ultrafiltrato attraversa poi il nefrostoma, penetra nel dotto reno-pericardico e raggiunge, dopo processi di assorbimento, il nefridioporo, posto nella camera esalante della cavità del mantello.

Nel *M. galloprovincialis* i sessi sono separati e gli organismi si riproducono per fecondazione esterna. Le femmine producono nelle ovaie una sostanza che, spargendosi nell'acqua di mare, provoca l'eiaculazione nei maschi vicini e, a sua volta, lo sperma eiaculato nell'acqua, scatena nelle femmine la deposizione delle uova.

Essendo organismi sedentari filtratori ed accumulatori di eventuali inquinanti di diverse tipologie, gli organismi di *Mytilus galloprovincialis* sono ampiamente utilizzati per studi ecotossicologici, in modo tale da determinare eventuali correlazioni tra la presenza di specifici inquinanti nell'ambiente acquatico e l'alterazione dei processi biologici.

2. SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi decenni l'ambiente naturale ha subito processi di degradazione dovuti, principalmente, alle attività antropiche. A contribuire al declino dell'integrità dell'ambiente acquatico agisce una varietà di composti chimici tra cui anche farmaci ad uso umano e veterinario, prodotti per la cura personale, microplastiche, etc., definiti nel loro insieme "contaminanti emergenti", che sebbene rappresentino una potenziale minaccia per l'ecosistema e la salute umana, non sono inclusi in normative e programmi di monitoraggio (Santos *et al.*, 2010). In particolare, l'aumento del consumo dei farmaci determina una loro crescente presenza in ambiente acquatico. Infatti, dopo l'assunzione, i farmaci vengono parzialmente escreti come tali o come metaboliti attivi e a causa del limitato tasso di rimozione da parte degli impianti di depurazione, entrano nei corsi d'acqua. Questi composti, essendo continuamente aggiunti, più velocemente di quanto si degradino, diventano pseudo-persistenti nell'ambiente.

A causa della natura conservativa di alcuni processi fisiologici, molte specie acquatiche possiedono molecole bersaglio simili a quelle dell'uomo, con le quali i residui dei farmaci possono interagire ed indurre effetti che nelle specie acquatiche sono indesiderati. Le informazioni riguardanti gli effetti dei farmaci sugli organismi acquatici sono, tuttavia, ancora limitate e per questo sono richieste ulteriori studi a riguardo.

Gli organismi cronicamente esposti ad ambienti inquinati, quali i mitili, hanno sviluppato un sistema di protezione per evitare gli effetti nocivi degli inquinanti stessi. Uno di questi sistemi è definito Multixenobiotic resistance (MXR): attraverso l'azione di trasporto di specifiche proteine transmembrana, quali Pgp ed MRP, esso agisce da meccanismo di detossificazione provvedendo all'estrusione degli xenobiotici dalle cellule. Alcune sostanze possono, però, interferire su questo delicato meccanismo, bloccandolo ed esponendo gli organismi acquatici agli effetti tossici degli inquinanti. Di enorme importanza risultano essere, dunque, le conoscenze sulla funzionalità di questo sistema di difesa.

In questo lavoro di Tesi è stato condotto uno studio sperimentale volto, appunto, a chiarire l'effetto di particolari contaminanti emergenti sul meccanismo MXR in emociti di *Mytilus galloprovincialis*. I farmaci analizzati, quali propranololo, fluoxetina e carbamazepina, sono stati presi in esame in quanto essi differiscono nelle loro modalità d'azione terapeutica, essendo rispettivamente un β -bloccante, un antidepressivo e un antiepilettico, in modo tale da prendere in esame un ampio spettro di casistiche, e per la loro elevata tossicità, persistenza e concentrazione

nell'ambiente. Mediante esperimenti *in vitro*, i quali hanno permesso di testare un ampio range di concentrazioni dei differenti farmaci, è stato valutato l'effetto di tali composti sull'attività MXR totale e sull'espressione dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC*, codificanti rispettivamente per le proteine Pgp ed MRP. In questo modo si è voluto determinare se i farmaci agiscano sulla funzionalità dei trasportatori e/o come modulatori trascrizionali, agendo, in questo caso, sull'espressione dei prodotti genici in esame.

3. METODI SPERIMENTALI

3.1 MANTENIMENTO DEGLI ANIMALI

Bivalvi appartenenti alla specie *Mytilus galloprovincialis*, nell'intervallo di tempo compreso tra maggio e ottobre 2014, sono stati acquisiti dalla Cooperativa Copr.al.mo. di Cesenatico. Portati in laboratorio, gli organismi sono stati mantenuti in un acquario contenente all'incirca 60 litri di acqua di mare (1 L di acqua di mare per ogni mitilo), costantemente aerata, in condizioni di temperatura e salinità costante (16 °C, 35 psu). In queste condizioni, i mitili sono stati stabulati per un periodo minimo di 3 giorni prima degli esperimenti. Per tutto il periodo di stabulazione, gli animali sono stati alimentati una volta al giorno con un mangime commerciale (Koral filtrator, Xaqua, Italy).

3.2 ESPERIMENTI *IN VITRO*

La locuzione latina "*in vitro*" è utilizzata per indicare studi effettuati su cellule, parti di tessuto o organi, prelevati dall'animale e mantenuti in condizioni osmotiche e termiche simili a quelle fisiologiche, per permettere loro di sopravvivere e/o di riprodursi.

Per l'effettuazione di questo studio sono stati applicati esclusivamente metodi che permettono di mantenere le cellule in condizione di sopravvivere, ma non di riprodursi, definiti "mantenimento *in vitro*", con lo scopo di valutare l'attività di trasporto MXR, e i livelli di mRNA per i trasportatori di membrana P-glicoproteina (P-gp) e Multidrug Resistance-Associated Protein 2 (MRP 2), appartenenti al sistema MXR.

3.3 ATTIVITA' DI TRASPORTO

3.3.1 PREPARAZIONE DI UNA COLTURA PRIMARIA DI EMOCITI DI MITILO

Tutte le procedure per la preparazione delle colture primarie e il trattamento *in vitro* degli emociti sono state condotte seguendo protocolli precedentemente descritti da Franzellitti e Fabbri (2013) con alcune modifiche. L'emolinfa di *Mytilus galloprovincialis* è stata prelevata dal muscolo adduttore posteriore dei mitili utilizzando una siringa da 1 mL contenente circa 100 µL di acqua di mare sintetica sterile (Fig. 3.1). L'emolinfa estratta da circa 40 animali per

esperimento è stata utilizzata per creare un unico pool favorendo, quindi, la rappresentatività del campione e ottenendo campioni sperimentali omogenei all'interno di ciascun esperimento.

Il pool di emolinfa è stato aliquotato in piastre per coltura cellulare da 12 pozzetti (1 mL/pozzetto), e le piastre sono state incubate per 30 minuti al buio e ad una temperatura di 16°C per permettere l'adesione degli emociti al fondo del pozzetto. L'avvenuta adesione è stata poi verificata mediante l'utilizzo di un microscopio ottico, dopo la sostituzione del mezzo.



Figura 3.1. Estrazione emolinfa

3.3.2 TRATTAMENTO *IN VITRO* DEGLI EMOCITI

Al termine del periodo di incubazione, il mezzo è stato sostituito con un opportuno volume (1 mL) di una miscela 1:1 costituita da acqua di mare sintetica sterile a 35 psu e siero ottenuto per centrifugazione e sterilizzazione dell'emolinfa totale secondo il protocollo descritto da Ciacci *et al.* (2011).

Campioni di controllo sono stati mantenuti, per tutta la durata del trattamento, al buio e ad una temperatura di 16 °C esclusivamente con tale miscela, mentre nei trattamenti a questa è stata aggiunta una concentrazione nota dei composti da testare.

Sono stati svolti due serie di esperimenti differenti:

1° SERIE – *Trattamento con inibitori modello per i trasportatori di membrana Pgp e MRP2, appartenenti al sistema MXR.*

Le cellule sono state trattate con 3 diversi inibitori Pgp-selettivi, ossia Ciclosporina A, Verapamil, e PSC833, e un inibitore MRP2-selettivo, l'MK571, aggiunti negli opportuni pozzetti a partire da soluzioni stock preparate nel solvente dimetilsolfossido (DMSO), ad una concentrazione di 10 μM . La concentrazione finale di DMSO è pari a 0.1% (v/v), concentrazione che esperimenti preliminari hanno mostrato non aver effetto sui parametri testati (dati non mostrati). La concentrazione di utilizzo di ciascun composto è stata selezionata sulla base della bibliografia (Tab. 3.1).

Tabella 3.1. Concentrazioni degli inibitori Pgp- e MRP- selettivi utilizzate nei mitili e concentrazioni efficaci (EC50) nei mammiferi e molluschi bivalvi.

Inibitore	Struttura chimica	Meccanismo d'interazione	EC50 Mammiferi	EC50 Mitili bivalvi	Concentrazioni testate
Verapamil (VER)		Calcio antagonista Inibitore competitivo per Pgp	0.2 μM (Lebedeva et al., 2011)	3 μM (Zaja et al., 2006)	20 μM (Smital et al., 2000) 50 μM (Rioult et al., 2014)
PSC833		Derivato non immunosoppressore della ciclosporina Inibitore non competitivo per Pgp	1 μM (Covelli, 1997)	1 nM (Litman et al., 2001)	10 μM (Rioult et al., 2014)
Ciclosporina A (CycA)		Immunosoppressore Inibitore non competitivo per Pgp	2-3 μM (Lebedeva et al., 2011)	3 μM (Zaja et al., 2006)	0.1 – 10 μM (Della Torre et al., 2014) 5 - 10 μM (Smital et al., 2000)
MK571		Inibitore dei recettori dei leucotrieni Inibitore ad alta specificità per MRP	3-5 μM (Lebedeva et al., 2011)	3 μM (Rioult et al., 2014)	0.1 – 20 μM (Della Torre et al., 2014) 10 μM (Rioult et al., 2014)

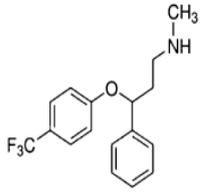
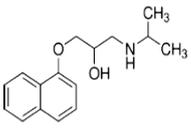
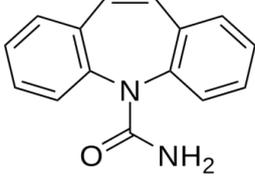
2° SERIE – *Trattamento con farmaci. Le cellule sono state trattate con concentrazioni crescenti di propranololo, fluoxetina e carbamazepina.*

Le sostanze sono state aggiunte nei pozzetti a partire da soluzioni stock preparate in acqua milliQ sterile, tenendo conto dei loro limiti di solubilità (Tab. 3.2), ad eccezione della carbamazepina,

preparata in DMSO. La concentrazione finale di DMSO è pari a 0.1% (v/v), concentrazione che esperimenti preliminari hanno mostrato non aver effetto sui parametri testati (dati non mostrati). Tutti e tre i farmaci sono stati analizzati in un ampio intervallo di concentrazioni che va da 1 nM (10^{-9} M) a 100 μ M (10^{-4} M).

Ciascun trattamento è stato effettuato in duplicato all'interno dello stesso esperimento (replicato tecnico), mentre l'intero esperimento è stato ripetuto 3 volte per ciascuna tipologia di trattamento (N = 3).

Tabella 3.2. Struttura, proprietà e concentrazioni ambientali e tossicologiche dei farmaci testati

	Fluoxetina (FX)	Propranololo (PROP)	Carbamazepina (CBZ)
			
Formula chimica	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O
Peso molecolare	309.33 g/mol	259.34 g/mol	236.3 g/mol
Solubilità in acqua	60.3 mg/L ^a	61.7 mg/L ^a	Insolubile in acqua
pKa	10.06 ^b	9.5 ^b	13.90 ^c
LogK_{ow}	1.57 (PH 7) ^b	5.7 (PH 9) ^b	2.30 ^c
Concentrazioni ambientali	Acque superficiali - 66 ng/L (Croazia) ^d - 46 ng/L (Canada) ^e - 2.6–111 ng/L (USA) ^f Acque marine - ≤3 ng/L ^g	Acque superficiali - ≤56 ng/L (UK, estuari) ^h - 590 ng/L (UK, rivers) ⁱ - 40–22.5 ng/L (Sud corea) ^l Acque marine - ≤1–93 ng/L (North Sea) ^m	Acque superficiali - 250 ng/L (Germania) ⁿ - 8 – 130 ng/L (Serbia, estuario) ^o - 4.5 – 61 ng/L (Corea del Sud) ^p Acque marine - 4 ng/L ^c
Concentrazioni tossicologiche	- Pseudokirchneriella subcapitata: EC50: 24 μ g/L (72h test inibizione crescita) ^b - Daphnia magna: EC50: 820 μ g/L (48 h) ^b - Oryzias latipes: LC50: 5500 (pH 7) 1300 (pH 8) 200 (pH 9) μ g/L (96 h test) ^q	- Pseudokirchneriella subcapitata: EC50: 770 μ g/L ^r - Daphnia magna: EC50: 7700 μ g/L (48 h test) ^s - Oryzias latipes: LC50: 10520–12380 μ g/L (96 h) ^t	- Pseudokirchneriella subcapitata: nessun effetto osservato (96 h inibizione della crescita) ^u - Daphnia magna: EC ₅₀ : > 13800 μ g/L (48 h) ^u - Oryzias latipes: LC ₅₀ : 35400 μ g/L ^p

a SRC, 2007

b Brooks et al., 2003

c McEneff et al., 2014

d Gros et al., 2006

e Metcalfe et al., 2003

f Bringolf et al., 2010

g Vasskog et al., 2008

h Thomas and Hilton, 2004

i Ashton et al., 2004

l kim et al., 2009b

m Wille et al., 2011

n Ternes, 1998

o Grujić et al., 2009

p Kim et al., 2007

q Nakamura et al., 2008

r Liu et al. 2009

s Cleuvers, 2005

t Kim et al., 2009a

u Ferrari et al., 2003

3.3.3 PREPARAZIONE E TRATTAMENTO DI BIOPSIE DI BRANCHE

Dopo il prelievo di emolinfa, utilizzando un apposito punch per biopsie dermiche (pfmmedical) sono state ottenute delle biopsie di tessuto branchiale omogenee per dimensioni (diametro 6 mm). Le biopsie sono state quindi trattate in piastre per colture cellulari (4 biopsie per pozzetto) con concentrazioni note di inibitori dell'attività dei trasportatori MXR (10 μ M Verapamil, 10 μ M Ciclosporina A, 20 μ M MK571), utilizzando le stesse condizioni di esposizione utilizzate per gli emociti. Le concentrazioni di inibitori utilizzate sono state selezionate sulla base di dati di bibliografia (Tab. 3.1).

3.4 VALUTAZIONE DELL'ATTIVITA' DI TRASPORTO

Il meccanismo MXR (Multixenobiotic resistance) negli organismi acquatici rappresenta la prima linea di difesa contro numerosi xenobiotici (Kurelec, 1992). Il meccanismo MXR è mediato dall'espressione di specifiche proteine che portano attivamente i composti tossici all'esterno del compartimento cellulare, prevenendo il loro accumulo cellulare e, dunque, i loro potenziali effetti dannosi. Le proteine aventi un ruolo nel meccanismo di detossificazione maggiormente studiate in contesto ecologico sono la P-glicoproteina (Pgp) e la Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP 2) appartenenti alla superfamiglia ABC (ATP binding cassette). L'interazione di determinati composti chimici con le proteine ABC può, tuttavia, alterare la funzione del meccanismo MXR, compromettendo il processo di detossificazione.

Valutare il tasso di accumulo dei substrati fluorescenti delle proteine P-gp e MRP2 in assenza e presenza dei composti esaminati rappresenta una buona metodologia per determinare la presenza e l'attività del meccanismo di difesa MXR.

Il substrato fluorescente che si è scelto di analizzare è la rodamina 123, essendo substrato di entrambe le proteine esaminate (Smital *et al.*, 2000; Daoud *et al.*, 2000; Vanderkolk *et al.*, 1998).

Dopo 15 min di pre-incubazione con i composti in esame, sia a cellule trattate che a cellule di controllo, è stato aggiunto un opportuno volume di una soluzione stock di

Rodamina 123 preparata in DMSO (concentrazione finale di DMSO = 0.1% v/v, in modo tale che la concentrazione finale Rodamina risulti 2.5 μ M). Le cellule sono state quindi incubate in queste condizioni per 90 min (Della Torre *et al.*, 2013). La stessa procedura sperimentale è stata utilizzata per gli esperimenti sulle biopsie di tessuto branchiale.

Terminato il periodo di incubazione, tutti i pozzetti sono stati lavati due volte con acqua di mare sintetica sterile. I campioni, poi, sono stati lisati aggiungendo in ciascun pozzetto 250 μ L di una soluzione di lisi (0.1% Triton X-100 in PBS 1X) e incubando le cellule per 5 minuti a temperatura ambiente al buio. I campioni di biopsie di branchie sono stati omogeneizzati con 500 μ L di soluzione di lisi, utilizzando un omogeneizzatore meccanico del tipo UltraTurrax (IKA). Al termine del procedimento gli omogenati sono stati centrifugati a 3000 xg, per 7 minuti a 4°C.

Sia i lisati cellulari che gli omogenati di tessuto sono stati, quindi, opportunamente diluiti e la fluorescenza dei campioni è stata rilevata mediante l'utilizzo di un fluorimetro Jasco modello FP-6200 (lunghezza d'onda di eccitazione = 485 nm; lunghezza d'onda di emissione = 530 nm). Per evitare la perdita di intensità di fluorescenza della Rodamina 123, tutte le fasi di manipolazione dei campioni sono avvenute al buio. I valori di intensità di fluorescenza sono stati normalizzati sul contenuto di proteine dei lisati cellulari o degli omogenati di tessuto, misurato mediante il saggio colorimetrico di Lowry (Lowry *et al.*, 1951). I dati finali sono espressi come media \pm SEM della variazione percentuale rispetto ai campioni di controllo.

3.5 VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ESPRESSIONE DEI PRODOTTI GENICI ABCB E ABCC DI MITILO

3.5.1 ESTRAZIONE RNA

Per i campioni di emociti, L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit Charge Switch total RNA cell kit (Life Technologies), appositamente studiato per l'estrazione di RNA da cellule, seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Per i campioni di tessuto, l'RNA totale è stato, invece, ottenuto per omogeneizzazione delle biopsie di branchie

nel reagente TRI reagent (Sigma Aldrich) seguendo il metodo descritto da Chomczynski e Sacchi (1987). L'RNA estratto è stato risospeso in un opportuno volume di acqua micro-filtrata (milliQ) sterile, ed è stata effettuata una verifica quali-quantitativa sia mediante lettura allo spettrofotometro ($\lambda = 260 \text{ nm}$) sia mediante elettroforesi orizzontale su gel denaturante (Sambrook *et al.*, 1989).

3.5.2 RETROTRASCRIZIONE

La retrotrascrizione è quella reazione che consente di ottenere da un filamento stampo di RNA, una molecola di DNA a singolo filamento ad esso complementare (cDNA). Questa reazione è catalizzata dalla trascrittasi inversa (o DNA polimerasi RNA-dipendente), un enzima che si serve del filamento di RNA come stampo, polimerizzando nel filamento di sintesi i deossinucleotidi-trifosfato (dNTPs) complementari alla sequenza del filamento stampo. La sintesi del cDNA è resa possibile dall'utilizzo di oligonucleotidi sintetici detti inneschi (o primers) che, appaiandosi alla sequenza dell'RNA ad essi complementari, costituiscono un piccolo tratto a doppio filamento dal quale la trascrittasi inversa può iniziare la sintesi del nuovo filamento.

Per ogni campione, il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 μg di RNA totale utilizzando il kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-rad Laboratories), seguendo il protocollo descritto dal produttore.

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

3.5.3 PCR REAL TIME

La Reazione a Catena della DNA Polimerasi (*Polymerase Chain Reaction, PCR*), tecnica che consente l'amplificazione di specifici segmenti di DNA di cui sia nota la sequenza delle due estremità terminali, fu messa a punto intorno alla metà degli anni Ottanta da K.B. Mullis (Mullis *et al.*, 1986). La reazione si svolge attraverso la ripetizione ciclica di una serie di passaggi. Il DNA di partenza è introdotto in una soluzione contenente deossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), ioni magnesio, una coppia di primers (forward e reverse), rappresentati da oligonucleotidi complementari agli

estremi 5' e 3' del filamento stampo e la DNA polimerasi, generalmente proveniente da organismi termofili, per evitare la denaturazione di questo enzima a temperature elevate. La soluzione così composta viene portata ad una temperatura compresa tra i 90 e i 98 °C, per favorire la denaturazione del DNA (fase di denaturazione). Successivamente la temperatura viene abbassata consentendo l'appaiamento dei primers alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati, solitamente fiancheggianti il frammento genico da amplificare (fase di annealing). I primers, appaiandosi a queste regioni, costituiscono un piccolo tratto di DNA a doppia catena dal quale, la DNA-polimerasi, previo innalzamento della temperatura, può iniziare la sintesi di DNA, ossia la formazione di legami fosfodiesterici tra l'estremità 3' del deossinucleotide trifosfato (dNTP) presente nel filamento stampo e quella 5' del deossinucleotide trifosfato (dNTP) complementare allo stampo (fase di estensione). Al termine della replicazione del filamento stampo il ciclo di PCR si ripete fino all'esaurimento dei reagenti presenti in soluzione.

Higuchi e collaboratori (Higuchi *et al.*, 1993), analizzando la cinetica della Reazione a Catena della Polimerasi (PCR), costruirono un sistema, denominato *real time* PCR, in grado di rilevare la cinetica della reazione di PCR in tempo reale. Questo sistema rileva la fluorescenza emessa durante la reazione da un cosiddetto *reporter*, un indicatore della produzione dell'amplificato, durante ogni ciclo di PCR, in particolare durante la fase lineare della reazione, quando si può stabilire una relazione lineare tra la quantità di prodotto di PCR e la quantità iniziale dell'RNA corrispondente al gene bersaglio contenuto nel template. In tal modo è possibile stimare indirettamente l'espressione del trascritto target nel campione in esame. La rilevazione quantitativa dell'amplificato può essere effettuata utilizzando diversi metodi per correlare l'incremento della fluorescenza emessa dal *reporter* alla quantità di amplificato prodotto. Il metodo impiegato in questa Tesi si basa sull'utilizzo del SYBR Green I, un agente intercalante in grado di emettere fluorescenza quando si lega in corrispondenza del solco minore della doppia elica di DNA. L'incremento di intensità della fluorescenza emessa ad ogni ciclo è espresso in un grafico che ricostruisce la cinetica della reazione di PCR (Fig. 3.2). Da questo grafico vengono quindi estrapolati i parametri necessari per la quantificazione. In particolare, si definisce ciclo soglia (Ct) il ciclo in cui si osserva un aumento significativo nel segnale di fluorescenza rilevato al di sopra di un valore soglia (Gibson *et al.* 1996). Il ciclo

soglia è compreso durante la fase esponenziale dell'amplificazione. Maggiore è la quantità iniziale del cDNA bersaglio, più velocemente sarà accumulato il prodotto di PCR, minore sarà il valore di Ct rilevato.

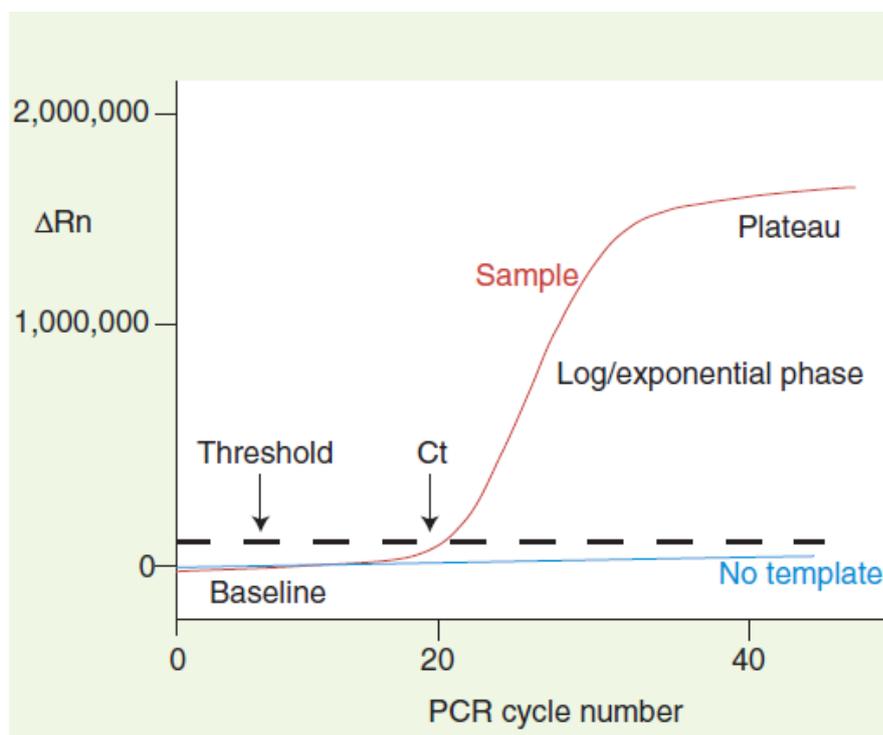


Figura 3.2. Schema di un singolo plot di amplificazione che illustra la nomenclatura comunemente utilizzata nella *real time* PCR. Sull'asse delle ordinate ritroviamo la fluorescenza, mentre sull'asse delle ascisse il numero dei cicli di PCR.

Per gli scopi di questa Tesi è stato impiegato un protocollo di quantificazione sia relativo che assoluto.

La quantificazione assoluta è stata utilizzata per valutare i livelli di espressione basale dei trascritti *ABCB* (codificante per una P-glycoproteina di mitilo) e *ABCC* (codificante per una proteina MRP di mitilo) e per permettere il confronto di tali livelli rilevati negli emociti e nelle biopsie di tessuto branchiale. Questo approccio richiede l'utilizzo di templati contenenti quantità note del prodotto genico in esame (*standards*) di cui vengono analizzate diverse repliche a diverse diluizioni per costruire una curva standard che esprima la relazione tra il numero di molecole del cDNA target e il valore misurato

di Ct. I dati sono espressi come numero di copie per il trascritto in esame riferito alla quantità nominale di RNA impiegata nella reazione di amplificazione.

La quantificazione relativa è stata utilizzata per valutare i profili di espressione dei trascritti target negli emociti trattati con diverse concentrazioni dei farmaci investigati nella presente Tesi. Questo approccio prevede l'utilizzo di campioni di riferimento (nel nostro caso i controlli non esposti ai diversi trattamenti), e l'analisi dell'espressione dei prodotti genici bersaglio simultaneamente all'analisi di controlli endogeni (*geni housekeepings*) utilizzati per la normalizzazione dei dati. I dati normalizzati sono espressi come rapporto d'induzione (*o fold change*) rispetto al campione di riferimento.

Per l'amplificazione dei trascritti di nostro interesse, sono stati utilizzati specifici primers per i geni *ABCB* e *ABCC* e per 6 controlli endogeni già utilizzati in precedenti lavori condotti nel nostro laboratorio (Franzellitti *et al.*, 2011; Martin-Diaz *et al.*, 2009; Franzellitti e Fabbri 2013; Franzellitti *et al.*, 2013; Franzellitti *et al.*, 2014; Tab. 3.3).

Tabella 3.3. Lista dei primers utilizzati per le analisi di *real time* PCR.

Primer	Taglia amplificato (bp)	Efficienza di amplificazione (%)	Referenze bibliografiche
mgABCB	139	112	Franzellitti e Fabbri, 2013
mgABCC	194	87.7	Della Torre <i>et al.</i> , 2013
Actina	120	114	Banni <i>et al.</i> , 2011
Tubulina	135	102	Cubero-Leon <i>et al.</i> , 2012
Fattore di elongazione $\alpha 1$	135	99	Ciocan <i>et al.</i> , 2011
RNA elicasi	129	132	Cubero-Leon <i>et al.</i> , 2012
18S	90	95	Dondero <i>et al.</i> , 2005
28S	142	94	Ciocan <i>et al.</i> , 2011

In accordo con le linee guida internazionali che definiscono i criteri di validità e qualità per i protocolli di qPCR (linee guida MIQE, *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time Experiments*; Bustin *et al.*, 2009), per entrambi gli approcci ciascuna coppia di primers è stata sottoposta a una fase di verifica preliminare in cui è

stata misurata la specificità dell'amplificazione mediante analisi dei prodotti di PCR via elettroforesi su gel d'agarosio, ed è stata determinata l'efficienza della reazione di amplificazione, definita come:

$$E = [(10^{-1/\text{slope}}) - 1] * 100$$

L'efficienza della reazione è quindi calcolata dalla pendenza (slope) di una retta di regressione ottenuta correlando i Ct e la quantità nominale di RNA ottenuta a partire da diluizioni scalari di un campione di cDNA (ciascuna diluizione è stata analizzata in triplicato) (Fig 3.3). I valori ottenuti in questo lavoro di Tesi sono risultati conformi con quelli riportati nei precedenti lavori (Tabella 3.3).

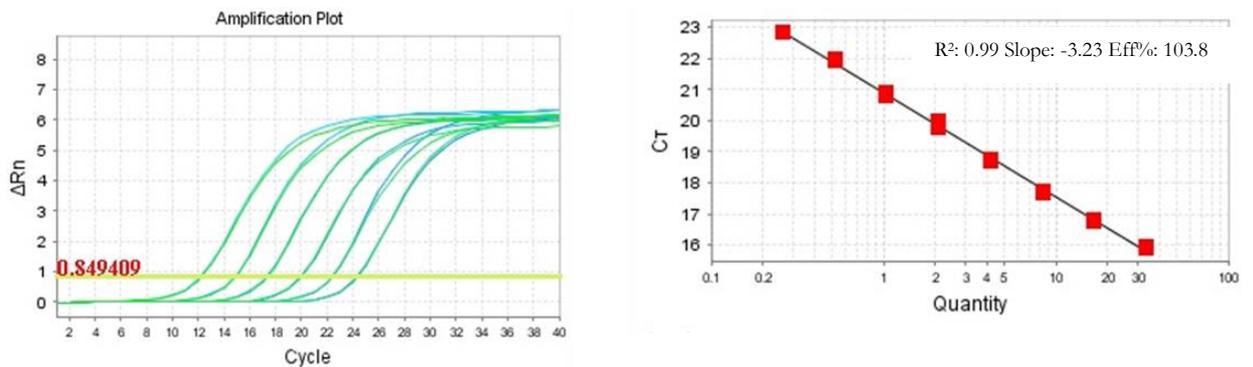


Figura 3.3. Esempio di curva di amplificazione e di curva standard per la quantificazione assoluta dell'espressione di trascritti codificanti per Pgp e MRP in emociti di *Mytilus galloprovincialis*.

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

1. Riproducibilità: la deviazione standard fra i Ct dei replicati per ciascun punto della retta deve essere sempre inferiore a 0.5
2. Linearità: il coefficiente di correlazione della retta deve essere maggiore o uguale a 0.99;

3. L'efficienza della reazione deve essere compresa tra il 90-120%.

Inoltre, sia nella fase di messa a punto che nella fase di analisi dei campioni sperimentali, dopo ogni reazione di amplificazione è stata effettuata una curva di dissociazione (*curva di melting*) per verificare l'assenza di prodotti di amplificazione aspecifici che potrebbero alterare la validità del risultato ottenuto (Fig. 3.4).

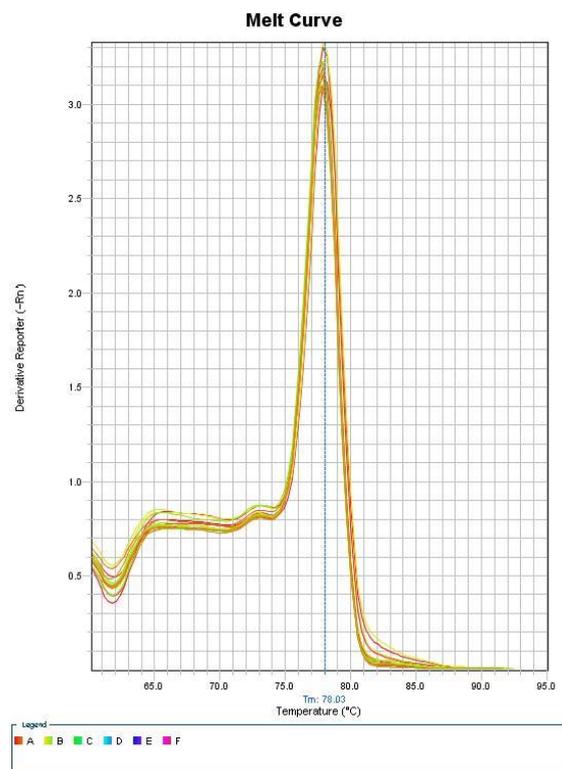


Figura 3.4. Curva di dissociazione (curva di melting)

Tutte le reazioni sono state condotte in un sistema per PCR real time del tipo StepOne (Life Technologies), impiegando un protocollo termico standard del tipo “*fast mode*”. Sia per l'amplificazione dei geni bersaglio che per i controlli endogeni, le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 10 μ L contenente: Fast Sybr Green mater mix (Life Technologies) 2X contenente tutti i reagenti necessari per l'amplificazione (DNA polimerasi, dNTPs, ecc...) e il reporter Sybr Green I, i due primers forward e reverse,

ciascuno alla concentrazione 0.2 o 0.5 μ M (dipendente dalla coppia di primers utilizzata) e una quantità di cDNA corrispondente a 15 ng di RNA totale di partenza.

Per la quantificazione relativa è stato inoltre necessario condurre uno studio preliminare per la selezione del migliore o dei migliori controlli endogeni per un'accurata normalizzazione dei dati. In questo lavoro di Tesi abbiamo seguito le indicazioni delle linee guida MIQE adottando una strategia per la normalizzazione dei dati basata sulla valutazione preliminare della stabilità dei livelli di espressione di un set di controlli endogeni nei campioni sperimentali, utilizzando il software geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Questo software analizza i valori di Ct per il set di controlli endogeni candidati nell'insieme dei campioni sperimentali e definisce una classifica dai geni più stabili. I 6 controlli endogeni valutati in questo lavoro di tesi sono riportati in Tabella 3.3. La valutazione preliminare della stabilità mediante geNorm ha quindi stabilito che actina e tubulina risultano i prodotti genici più stabili nelle condizioni sperimentali analizzate, e per questo utilizzati come controlli endogeni per la normalizzazione dei dati nei saggi definitivi. Il calcolo dei *fold change* e l'analisi dei risultati è stato effettuato attraverso i software StepOne e Expression Suite (Life Technologies), che utilizzano il metodo di quantificazione relativa descritto da Livak e Schmittgen (2008); il quale si basa sul confronto dei valori di Ct rilevati per il gene bersaglio tra il campione in esame (in questo caso il cDNA ottenuto dagli organismi sottoposti al trattamento) e un campione di riferimento (ovvero il controllo sperimentale) attraverso le seguenti formule matematiche:

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

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

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

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

Dove E è l'efficienza della reazione di PCR.

3.3.5 SAGGIO DI CITOTOSSICITA'

Per avere un'indicazione sulla vitalità cellulare e di conseguenza sulla tossicità dei composti testati è stato utilizzato il saggio quantitativo colorimetrico MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Mosmann, 1983). Tale saggio valuta l'attività degli enzimi mitocondriali succinato deidrogenasi nel trasformare, mediante la rottura dell'anello tetrazolico, il sale MTT, di colore giallo tenue, in cristalli di formazano, di colore porpora. Il formazano prodotto viene disciolto in isopropanolo acidificato, composto che conferisce la caratteristica colorazione blu alla soluzione. Tale reazione è indicativa dell'attività cellulare in quanto può avvenire solamente quando le cellule sono metabolicamente attive, in caso contrario l'MTT non può essere convertito in formazano, mancando gli appropriati enzimi, e la sostanza prende il colore giallo tenue dell'MTT. Per valutare e misurare la reazione viene effettuata una lettura spettrofotometrica del campione, alla lunghezza d'onda di 570 nm. I valori di assorbanza sono proporzionali alla quantità di formazano prodotta e quindi all'attività metabolica e alla vitalità cellulare.

Il saggio MTT è stato effettuato in un sistema a micropiastre. Gli emociti sono stati seminati in piastre per coltura cellulare da 96 pozzetti seguendo le procedure già descritte nel paragrafo 3.3.2, ma utilizzando 300 µL di emolinfa per ciascun pozzetto. Ciascuna condizione di trattamento è stata valutata in quadruplicato.

Dopo l'esposizione ai composti, il mezzo è stato rimosso e le cellule sono state incubate per 90 min con 150 µL di una soluzione di MTT ad una concentrazione di 5 mg/mL, preparata in acqua di mare sintetica. Successivamente, sono stati aggiunti 150 µL di isopropanolo acidificato ed è stata letta l'assorbanza a 570 nm mediante uno spettrofotometro per micropiastre (EL808, Biotek) con sottrazione di background a 650 nm.

La vitalità cellulare è stata espressa come variazione percentuale dell'assorbanza netta fra i campioni trattati e i controlli non trattati.

3.5 ANALISI STATISTICA

I dati relativi all'attività di trasporto e alla vitalità cellulare sono stati espressi come la media \pm ES dei valori ottenuti per ciascuno degli esperimenti indipendenti (N = 3). I dati relativi all'espressione basale dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC* sono riportati come medie \pm ES di campioni di cellule o biopsie di tessuto proveniente da 6 mitili (N = 6). La significatività dei risultati è stata testata utilizzando il software SigmaStat mediante analisi della varianza a 1 via seguita dal test di Bonferroni per i confronti multipli tra gruppi di dati. I dati di *real time* PCR ottenuti attraverso la quantificazione relativa sono stati analizzati con il software REST (Pfaffl *et al.*, 2002), appositamente sviluppato per l'analisi statistica dei dati di *real time* PCR, il quale utilizza un test di randomizzazione per valutare la significatività statistica delle differenze nell'espressione tra ciascun gruppo di trattamento e il controllo. In ogni caso, le differenze sono considerate statisticamente significative per $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 ATTIVITA' BASALE IN PRESENZA DI INIBITORI MODELLO

La prima fase di questo lavoro di Tesi si è focalizzata sulla caratterizzazione dell'attività dei trasportatori MXR negli emociti di organismi appartenenti alla specie *Mytilus galloprovincialis*. A tale scopo gli emociti sono stati trattati, *in vitro*, in assenza (ctr) o presenza di inibitori selettivi dell'attività di trasporto delle proteine transmembrana in esame, normalmente impiegati come strumenti di analisi negli studi riguardanti i mammiferi (Tab. 3.1). Tutte le sostanze sono state utilizzate ad una concentrazione di 10^{-5} M.

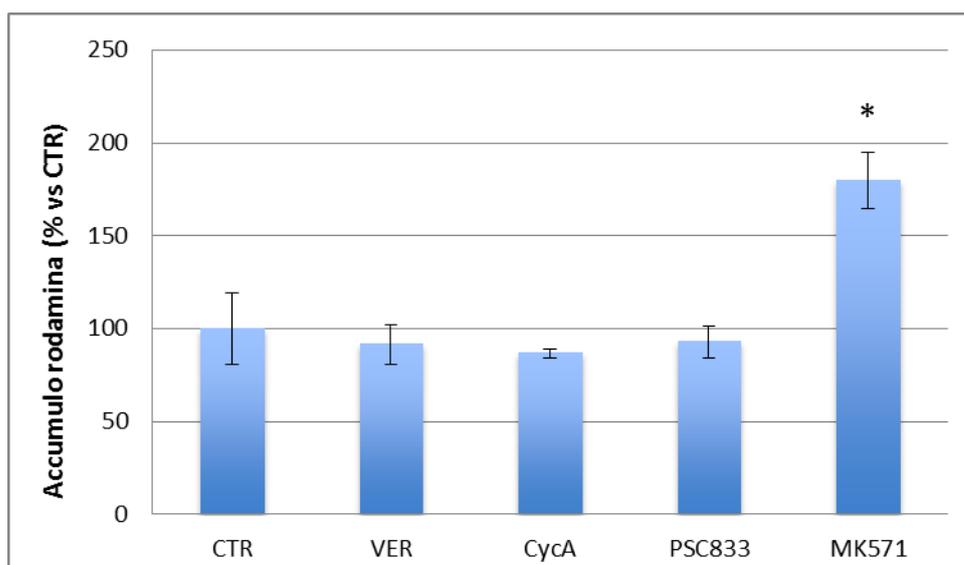


Figura 4.1. Effetto degli inibitori specifici di MRP2 e Pgp sull'accumulo del substrato fluorescente. L'accumulo di rodamina 123 è stato determinato negli emociti in presenza di Verapamil (VER), Ciclosporina A (CycA) e PSC883, inibitori specifici per Pgp, e MK571, inibitore per MRP. Tutti i composti sono stati testati alla medesima concentrazione di 10^{-5} M. I valori sono espressi come percentuale di variazione rispetto al controllo. I dati sono espressi come media \pm ES. * indica differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Dalla Figura 4.1 risulta chiaro che non sono state osservate variazioni apprezzabili dell'accumulo di rodamina 123 in presenza degli inibitori selettivi per Pgp, mentre nelle cellule trattate con MK571, inibitore selettivo per MRP, si osserva un significativo

aumento dell'accumulo del substrato fluorescente, rispetto alle cellule non trattate (controlli), indice di una ridotta attività di trasporto. Questi risultati suggeriscono che vi è uno scarso contributo di Pgp sull'attività di trasporto MXR totale negli emociti, mentre l'attività MRP-mediata è ben quantificabile. Gli esperimenti condotti trattando le cellule con concentrazioni crescenti di MK571 (Fig. 4.2) mostrano inoltre che l'effetto di questo inibitore MRP selettivo è dose dipendente.

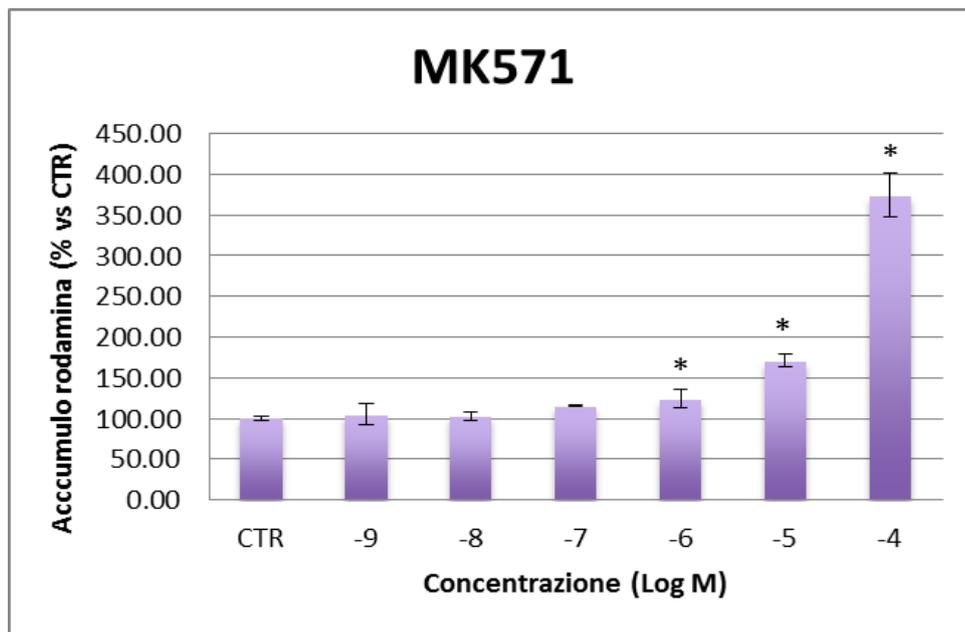
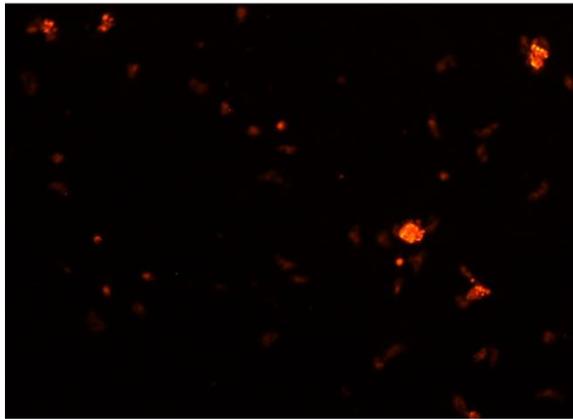
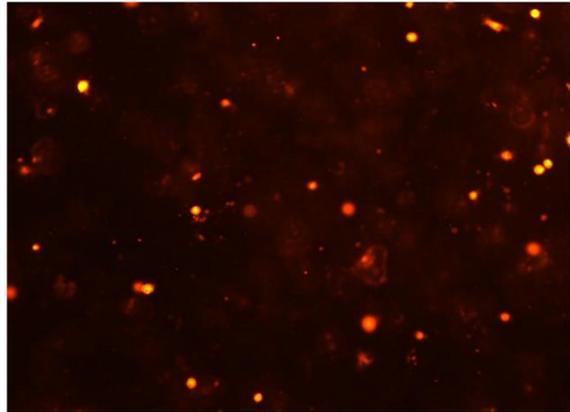


Figura 4.2. Effetto di Pgp e MRP2 sull'accumulo del substrato fluorescente. L'accumulo di rodamina 123 è stato determinato in presenza di differenti concentrazioni di MK571. In parallelo, emociti di controllo (ctr) sono stati mantenuti nelle stesse condizioni sperimentali degli emociti esposti ai diversi trattamenti. I dati sono espressi come media \pm ES della variazione rispetto al controllo. * indica differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Per confermare i risultati ottenuti mediante il saggio sull'attività di trasporto, sono state condotte analisi qualitative al microscopio a fluorescenza. Le immagini così ottenute sono riportate in Figura 4.3, provando l'esattezza dei risultati pervenuti dalle precedenti analisi.



controllo 20X



MK571 20X

Figura 4.3. Accumulo di rodamina 123 in emociti di *Mytilus galloprovincialis*, trattati con MK571 (10^{-4} M) e propranololo (10^{-7} M). Il segnale di fluorescenza è stato visualizzato tramite un microscopio a fluorescenza.

Per avvalorare l'esattezza della modalità di esecuzione del saggio sull'attività di trasporto negli emociti è stato condotto, nelle medesime condizioni sperimentali un esperimento su biopsie di tessuto branchiale (Fig. 4.4).

Tutte le sostanze testate hanno indotto un significativo aumento dell'accumulo di rodamina 123 rispetto alle condizioni di controllo.

Gli inibitori a maggior effetto risultano essere la ciclosporina A, inibitore Pgp selettivo, e l'MK571, inibitore MRP selettivo. Entrambi gli inibitori, infatti, determinano un accumulo di rodamina all'interno della cellula circa 2.5 volte superiore rispetto a quello del controllo. Il verapamil, inibitore Pgp selettivo, induce solamente un modesto accumulo pur significativo (Fig. 4.4). Pertanto risulta chiaro che nelle branchie entrambe le proteine transmembrana esaminate contribuiscono all'attività di trasporto MXR e che gli inibitori Pgp selettivi, avendo differenti modalità di interazione con la proteina, influenzano in maniera differente l'attività di trasporto.

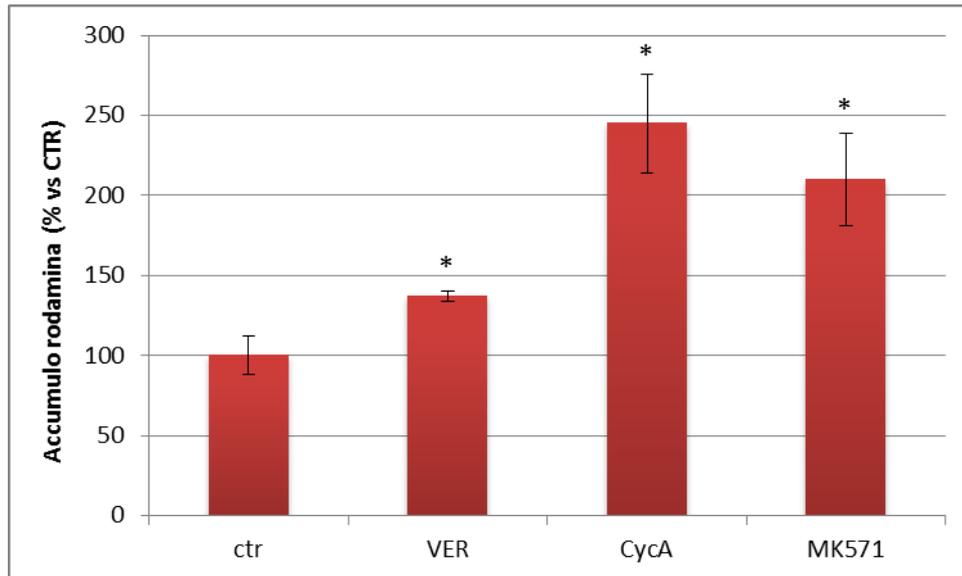


Figura 4.4. Effetto degli inibitori di Pgp e MRP2 sull'accumulo del substrato fluorescente. L'accumulo di rodamina 123 è stato determinato in presenza di Verapamil (20 μ M), Ciclosporina A (10 μ M) e MK571 (20 μ M). I valori sono espressi come percentuale rispetto al controllo. I dati sono espressi come media \pm ES. * indica differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

4.2 ESPRESSIONE BASALE DEI PRODOTTI GENICI *ABCB* E *ABCC*

I livelli di espressione basale dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC*, che codificano per i trasportatori Pgp e MRP2 di mitilo, sono stati valutati mediante la tecnica della PCR *real time*, utilizzando curve standard ottenute da quantità note del prodotto di PCR purificato.

I risultati riportati in Figura 4.5 mostrano che entrambi i trascritti vengono rilevati sia nelle branchie che negli emociti analizzati in condizioni basali. Negli emociti i livelli di *ABCC* sono significativamente più elevati rispetto a quelli di *ABCB*, che è espresso ad un livello pari a circa 17 copie/ng RNA, mentre nelle branchie i due trascritti presentano mediamente gli stessi livelli di espressione (circa 40 copie/ng RNA).

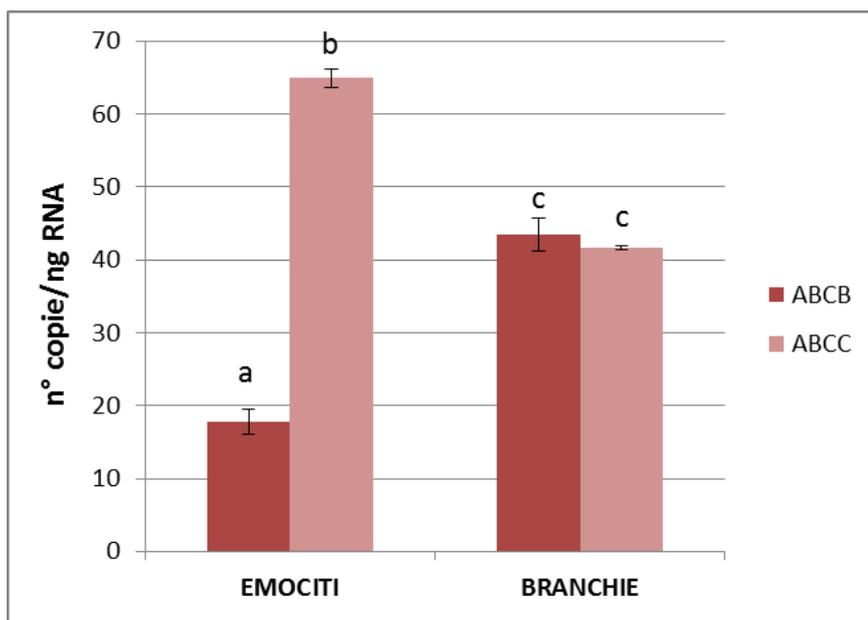


Figura 4.5. Analisi dei livelli di espressione dei prodotti genici in emociti e branchie di organismi di *Mytilus galloprovincialis*. I livelli di espressione dei prodotti genici ABCB e ABCC sono stati normalizzati con quelli dei geni della β -actina e della tubulina. Lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

4.3 MODULAZIONE DELL'ATTIVITA' DI TRASPORTO IN EMOCITI TRATTATI CON I FARMACI

Nelle Figure 4.6, 4.7 e 4.8 è riportata la variazione dell'attività di trasporto MXR in emociti di mitilo, trattati *in vitro* con tre farmaci, un antidepressivo, la fluoxetina, un beta bloccante, il propranololo e un antiepilettico, la carbamazepina.

Come si può notare in Figura 4.6, il propranololo genera un andamento a campana dell'attività totale di trasporto. Tale composto induce una riduzione dell'attività di trasporto delle proteine esaminate, ovvero determina un accumulo di rodamina 123 all'interno delle cellule, alle basse concentrazioni, con un punto di massimo accumulo a 10^{-7} M. Tuttavia, all'aumentare delle concentrazioni l'azione inibitoria del propranololo si riduce fino a determinare, alla più alta concentrazione testata (10^{-4} M), una riduzione significativa dell'accumulo di rodamina, ovvero un aumentato tasso di efflusso dalla cellula (Fig. 4.6).

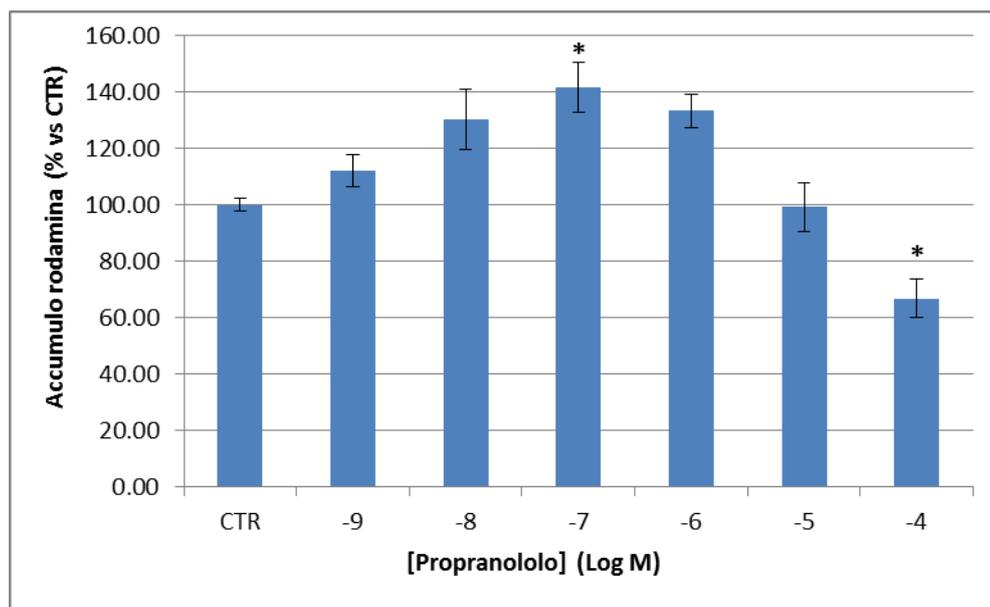


Figura 4.6. L' effetto di Pgp e MRP2 sull'accumulo di rodamina 123 è stato determinato in presenza di differenti concentrazioni di propranololo. In parallelo, emociti di controllo (ctr) sono stati mantenuti nelle stesse condizioni sperimentali degli emociti esposti ai diversi trattamenti. I dati sono espressi come media \pm ES della variazione rispetto al controllo. * indica differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Il trattamento con la carbamazepina induce una riduzione relativa dell'accumulo di rodamina 123 a partire dalla concentrazione 10^{-6} M, indice di un'aumentata attività di trasporto (Fig. 4.7).

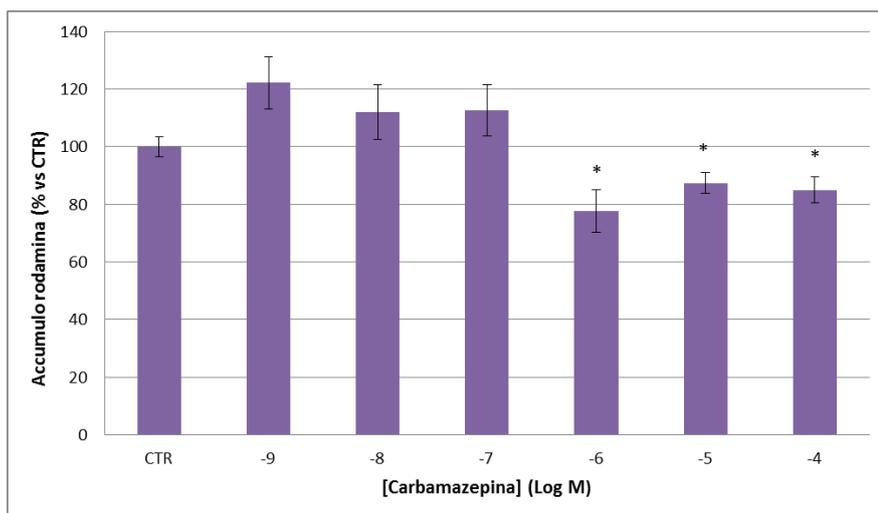


Figura 4.7. L'effetto di Pgp e MRP2 sull'accumulo di rodamina 123 è stato determinato in presenza di differenti concentrazioni di carbamazepina. In parallelo, emociti di controllo (ctr) sono stati mantenuti nelle stesse condizioni sperimentali degli emociti esposti ai diversi trattamenti. I dati sono espressi come media \pm ES della variazione rispetto al controllo. * indica differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Il trattamento con la fluoxetina induce un effetto significativo solo alla più alta concentrazione testata, dove l'accumulo di rodamina 123 risulta significativamente ridotto rispetto al controllo, indice di un'aumentata attività di trasporto (Fig. 4.8).

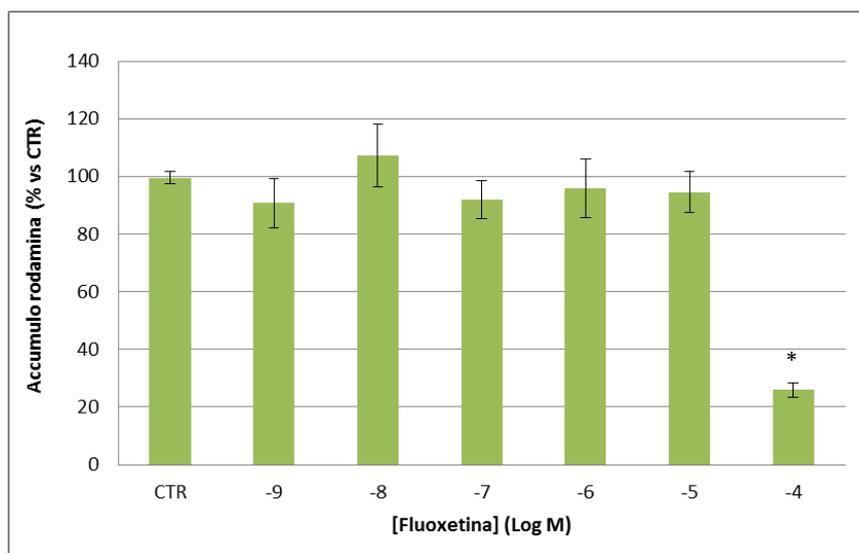


Figura 4.8. Effetto di Pgp e MRP2 sull'accumulo di rodamina 123. Tale accumulo è stato determinato in presenza di differenti concentrazioni di fluoxetina. In parallelo, emociti di controllo (ctr) sono stati mantenuti nelle stesse condizioni sperimentali degli emociti esposti ai diversi trattamenti. I dati sono espressi come media \pm ES della variazione rispetto al controllo. * indica differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

4.4 ESPRESSIONE DEI PRODOTTI GENICI *ABCB* E *ABCC* IN EMOCITI DI MITILO TRATTATI CON I FARMACI

L'espressione dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC*, codificanti per i trasportatori di membrana P-glicoproteina (Pgp) e Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2), è stata valutata negli emociti trattati con concentrazioni crescenti delle sostanze esaminate.

L'espressione del prodotto genico *ABCB* è invariata a seguito del trattamento delle cellule con propranololo 10^{-9} M e 10^{-8} M, e significativamente ridotta nelle cellule trattate con propranololo da 10^{-7} M a 10^{-5} M. *ABCC* è sotto espresso nelle cellule trattate con propranololo 10^{-9} M e 10^{-8} M, mentre alle concentrazioni da 10^{-7} M e 10^{-5} M non si osservano variazioni significative. Il trattamento con propranololo 10^{-4} M induce una significativa sovra espressione di entrambi i prodotti genici.

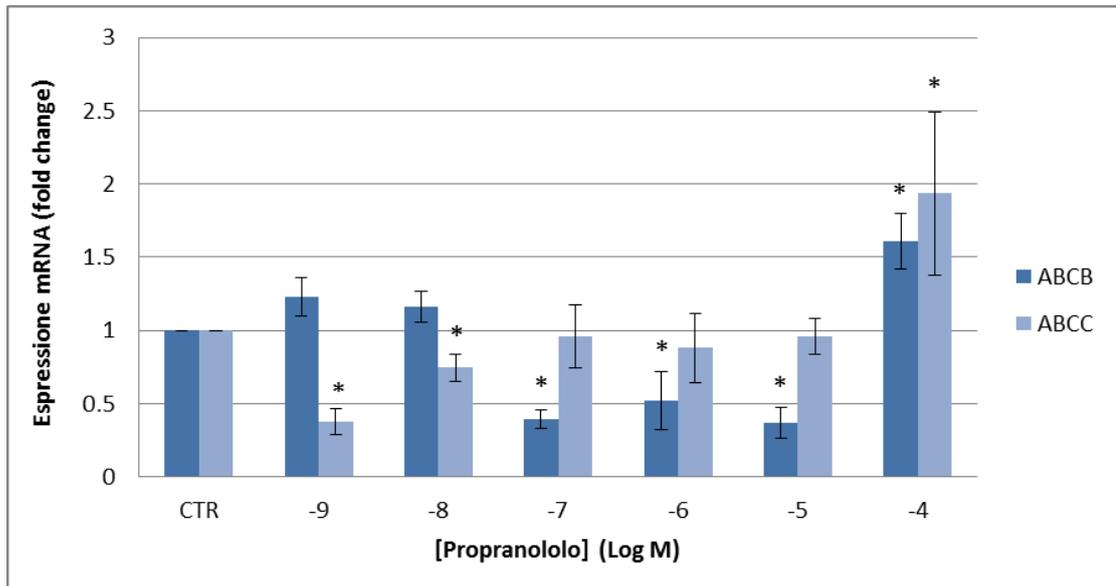


Figura 4.9. Variazioni dei livelli di espressione dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC* in emociti di mitili esposti a diverse concentrazioni di propranololo. In parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. I livelli di espressione dei prodotti genici sono stati valutati mediante *real time* PCR secondo quanto riportato in materiali e metodi. I livelli di espressione sono stati normalizzati su quelli della β -actina e della tubulina, utilizzati come controlli endogeni. I dati sono stati espressi come la media \pm ES dei rapporti di induzione rispetto al controllo. * indica differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

L'espressione del prodotto genico *ABCB* viene significativamente aumentata nelle cellule trattate con carbamazepina a partire dalla concentrazione 10^{-7} M. Nello stesso intervallo di concentrazioni, il prodotto genico *ABCC* risulta, invece, significativamente sotto espresso (Fig. 4.10).

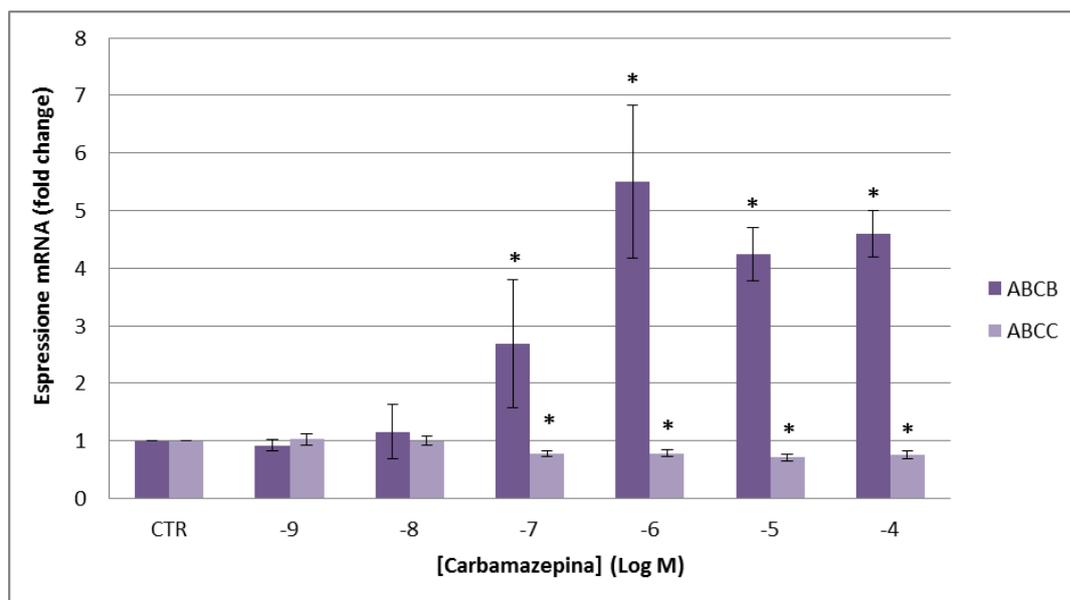


Figura 4.10. Variazioni dei livelli di espressione dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC* in emociti di mitili esposti a diverse concentrazioni di carbamazepina. In parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. I livelli di espressione dei prodotti genici sono stati valutati mediante *real time* PCR secondo quanto riportato in materiali e metodi. I livelli di espressione per i prodotti genici in esame sono stati normalizzati su quelli della β -actina e della tubulina, utilizzati come controlli endogeni. I dati sono stati espressi come la media \pm ES dei rapporti di induzione rispetto al controllo. * indica differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

Nelle cellule trattate con la fluoxetina si riscontra una sovra espressione del prodotto genico *ABCB* alle concentrazioni intermedie (10^{-8} M a 10^{-6} M), mentre nessuna variazione significativa è stata osservata alle altre concentrazioni. Per quanto riguarda l'espressione del prodotto genico *ABCC* non si riscontrano variazioni significative dei livelli di espressione nell'intervallo di concentrazioni testate (Fig. 4.11).

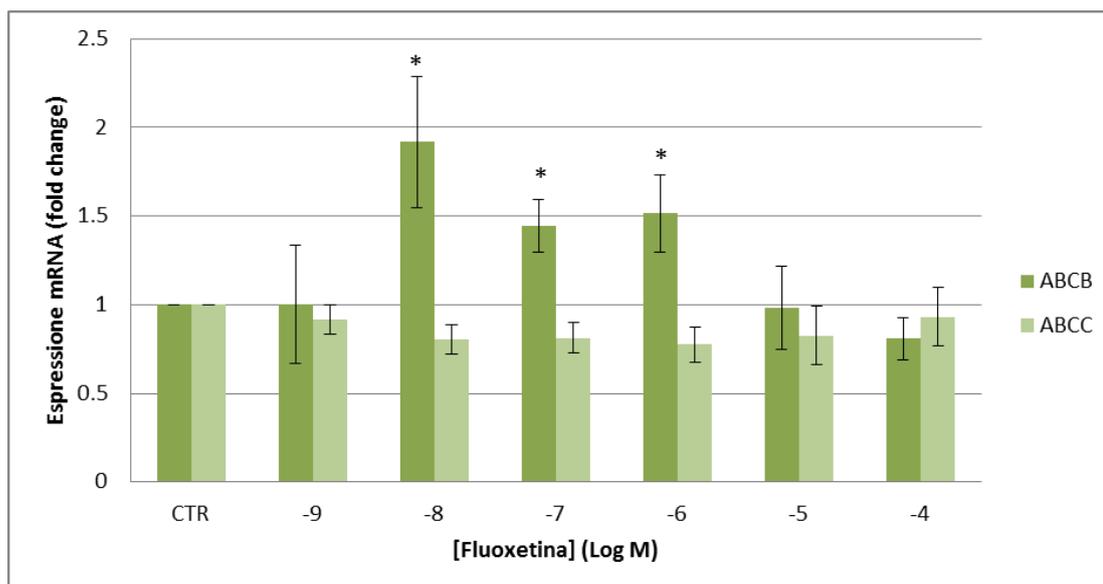


Figura 4.11. Variazioni dei livelli di espressione dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC* in emociti di mitili esposti a diverse concentrazioni di fluoxetina. In parallelo, un gruppo di organismi di controllo (ctr) è stato mantenuto nelle stesse condizioni sperimentali degli organismi esposti ai diversi trattamenti. I livelli di espressione genica sono stati valutati mediante *real time* PCR secondo quanto riportato in materiali e metodi. I livelli di espressione per prodotti genici in esame sono stati normalizzati su quelli della β -actina e della tubulina, utilizzati come controlli endogeni. I dati sono stati espressi come la media \pm ES dei rapporti di induzione rispetto al controllo. * indica differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

4.5 SAGGIO DI CITOTOSSICITA'

Per avere un'indicazione sulla tossicità dei farmaci testati è stato utilizzato il saggio quantitativo colorimetrico MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Mosmann, 1983).

I risultati di tali analisi mostrano che solo un farmaco, la fluoxetina ha un effetto significativo sulla vitalità cellulare degli emociti nell'intervallo di concentrazioni testate. Una significativa riduzione della vitalità cellulare è stata individuata a partire dalla concentrazione 10^{-7} M di fluoxetina (Fig. 4.12). Il trattamento con propranololo e con la carbamazepina non ha indotto, invece, alterazioni significative (Fig. 4.13 e 4.14).

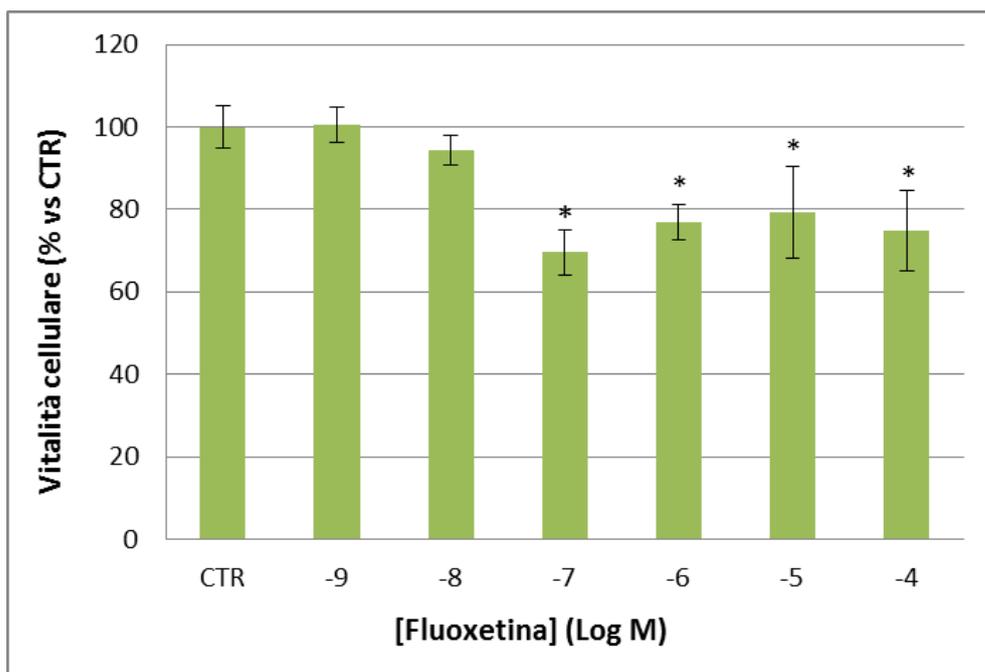


Figura 4.12. Saggio di vitalità di campioni sottoposti a diverse concentrazioni di Fluoxetina, come descritto nella sezione dei materiali e metodi. I dati rappresentano la media \pm ES rispetto al controllo. * indica differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

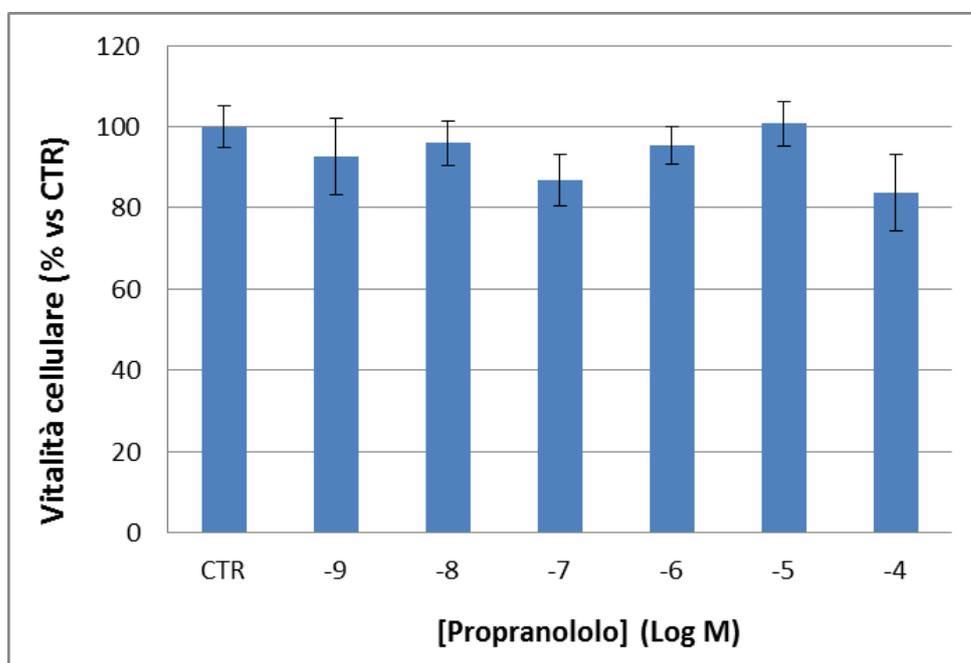


Figura 4.13. Saggio di vitalità di campioni sottoposti a diverse concentrazioni di propranololo, come descritto nella sezione dei materiali e metodi. I dati rappresentano la media \pm ES rispetto al controllo. * indica differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

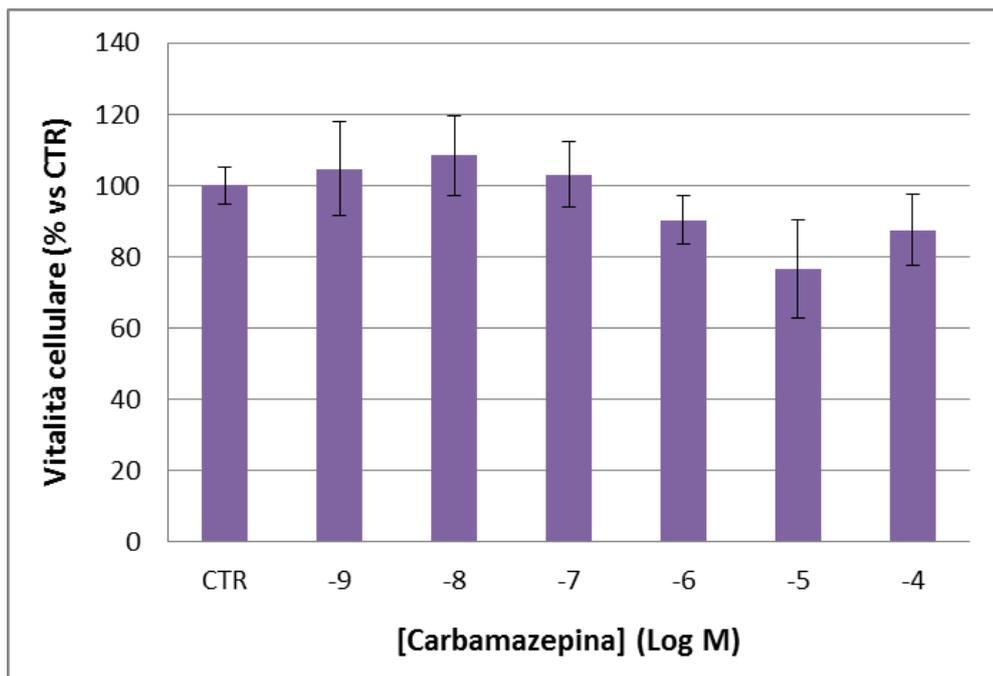


Figura 4.14. Saggio di vitalità di campioni sottoposti a diverse concentrazioni di carbamazepina, come descritto nella sezione dei materiali e metodi. I dati rappresentano la media \pm ES rispetto al controllo. * indica differenze statisticamente significative ($p < 0.05$, ANOVA a 1 via seguita dal Bonferroni t-test).

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Recentemente la comunità scientifica ha focalizzato la propria attenzione sulla presenza di un gruppo di composti chimici definiti contaminanti emergenti. Questi composti sono considerati una minaccia per l'ecosistema e per l'uomo (Santos *et al.*, 2010), ma ciò nonostante non presentano una precisa classificazione né un programma di monitoraggio. Tra i contaminanti emergenti ricordiamo i prodotti farmaceutici, sostanze continuamente immesse negli scarichi urbani, sia domestici che ospedalieri (Fent *et al.*, 2006), le quali non vengono completamente rimosse dai sistemi di depurazione, determinando un loro continuo rilascio nell'ambiente acquatico. I farmaci in tale ambiente, sebbene si presentino a basse concentrazioni (tra ng/L e µg/L), possono avere effetti negativi sugli organismi acquatici (Martin-Diaz *et al.*, 2009). Per sopravvivere ad ambienti contaminati, gli organismi si avvalgono di alcuni meccanismi di protezione, fra cui il sistema definito Multixenobiotic resistance (MXR). Tale meccanismo si avvale dell'attività di specifiche proteine transmembrana, quali le proteine appartenenti alla superfamiglia ABC, aventi il compito di precludere la permanenza dei composti tossici all'interno della cellula. Molte sostanze farmaceutiche possono, tuttavia, alterare la funzione di questo meccanismo (Kurelec, 1995), portando gli organismi ad essere maggiormente esposti all'effetto tossico dei contaminanti.

In questo lavoro di Tesi è stato condotto uno studio sperimentale volto a chiarire l'effetto di particolari contaminanti emergenti, quali propranololo, carbamazepina e fluoxetina sul meccanismo MXR in emociti di *Mytilus galloprovincialis*. L'effetto di tali inquinanti è stato valutato analizzando dapprima l'attività MXR totale e successivamente l'espressione dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC*, codificanti rispettivamente per le proteine Pgp e MRP, coinvolte nel meccanismo MXR.

5.1 TRATTAMENTO CON INIBITORI MODELLO

Esperimenti preliminari, utilizzando inibitori selettivi dell'attività di trasporto per Pgp e per MRP, sono stati svolti per valutare il ruolo delle proteine in esame sull'efflusso di xenobiotici in emociti di *Mytilus galloprovincialis*.

Nessuno dei tre inibitori Pgp selettivi (verapamil, ciclosporina A e PSC833), testati ad una concentrazione di 10 μ M, induce, negli emociti, una differenza significativa sull'accumulo del substrato fluorescente rodamina 123 rispetto al controllo (Fig. 4.1). Tale dato dimostra uno scarso contributo di Pgp nell'attività MXR totale, in accordo con quanto riportato in precedenti studi (Rioult *et al.*, 2014; Svensson *et al.*, 2003; Luckenbach *et al.*, 2004).

Al contrario, nelle cellule trattate con MK571, inibitore MRP selettivo, si osserva un accumulo dose dipendente del substrato fluorescente (Fig. 4.2), per cui all'aumentare del composto in esame aumenta l'accumulo di rodamina 123 all'interno della cellula, confermando il ruolo esclusivo di MRP nell'attività di trasporto, come recentemente rilevato negli emociti di *M. edulis* da Rioult *et al.* (2014) e in emociti di *M. galloprovincialis* da Della Torre *et al.* (2014).

I livelli di espressione basale dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC* (Fig. 4.5) chiariscono i risultati ottenuti dalle analisi dell'attività di trasporto. Lo scarso contributo di Pgp all'attività MXR è, infatti, correlato ad un basso livello di espressione basale del prodotto genico *ABCB* mentre, i livelli molto elevati di *ABCC* confermano il ruolo predominante di MRP nell'efflusso di xenobiotici. Negli emociti i livelli più elevati di trascritti per MRP rispetto a quelli per Pgp e ai livelli di espressione di *ABCC* nelle branchie, è da ricercare nel ruolo fisiologico dell'emolinfa, tessuto implicato nel trasporto di vari composti organici, substrati esclusivi di MRP (Litman *et al.*, 2001). Precedenti studi hanno, infatti, elucidato il ruolo di MRP nel trasporto di glutatione, glucuronidi, anioni organici (Jedlitschky *et al.*, 1996), come anche di bilirubina e di metaboliti dell'estradiolo (Zaja *et al.*, 2008).

Per avvalorare la metodica utilizzata per l'esecuzione del saggio dell'attività di trasporto è stato effettuato un controllo positivo, analizzando l'attività di trasporto MXR, in presenza dei medesimi inibitori, sulle branchie di organismi di *Mytilus galloprovincialis*. Il trattamento di biopsie di branchie con inibitori selettivi (Fig. 4.4) mostra un effetto consistente di tutti gli inibitori utilizzati, sia Pgp selettivi (20 μ M verapamil e 10 μ M ciclosporina A) che MRP selettivi (20 μ M MK571). È interessante notare come l'MK571 e la ciclosporina A determinano un medesimo accumulo di substrato fluorescente, circa 2.5 volte il controllo, pur essendo inibitori selettivi per le

due diverse proteine esaminate. Tutto ciò porta a confermare i risultati scaturiti da precedenti studi, i quali affermano un ruolo attivo di entrambi i trasportatori transmembrana sull'efflusso di xenobiotici nelle branchie di mitili, rendendo queste un'ottima barriera protettiva contro l'ingresso di sostanze inquinanti nell'organismo (Della Torre *et al.*, 2014; Galgani *et al.*, 1996; Luckenbach e Epel, 2008).

Le analisi riguardanti i livelli di espressione basale dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC* confermano tale teoria, in quanto nelle branchie i due prodotti genici esaminati presentano eguali livelli di espressione (Fig. 4.5). Questo può essere dovuto al ruolo fisiologico delle branchie. Infatti, le branchie dei mitili possono essere viste come strutture a duplice funzione, esse infatti favoriscono l'afflusso di nutrienti e contemporaneamente prevengono l'ingresso di xenobiotici mediante l'impiego di numerosi trasportatori tra cui quelli appartenenti alla superfamiglia ABC (Luckenbach e Epel, 2008).

5.2 TRATTAMENTO CON FARMACI

Gli esperimenti volti a valutare gli effetti a livello trascrizione e funzionale in cellule trattate con i contaminanti in esame, concorrono a dimostrare l'importante effetto del propranololo, della carbamazepina e della fluoxetina sulla modulazione dell'espressione dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC*, negli emociti di *Mytilus galloprovincialis*.

Le cellule trattate con propranololo mostrano un andamento a campana dell'attività MXR, per cui vi è un accumulo crescente di substrato fluorescente alle basse concentrazioni, con un picco a 10^{-7} M, ed una successiva decrescita dello stesso a concentrazioni elevate (Fig. 4.6). Andamento speculare si ritrova nei livelli di espressione del prodotto genico *ABCB* in cellule esposte al contaminante in questione (Fig. 4.9), portandoci ad affermare un ruolo principale di Pgp nell'efflusso di xenobiotici e l'azione modulatoria del propranololo sull'espressione di *ABCB* negli emociti.

Recenti studi condotti *in vivo* sui mitili esposti a composti farmaceutici e su emociti (Franzellitti e Fabbri, 2013; Franzellitti *et al.*, 2013) hanno dimostrato che il

propranololo, antagonista dei recettori β -adrenergici e antagonista dei recettori della serotonina (Tierney, 2001), modifica i livelli di espressione di *ABCB*, agendo sui livelli intracellulari di cAMP e sull'attività della proteina chinasi cAMP-dipendente (PKA). Ciò dimostra un significativo controllo cAMP/PKA dipendente sulla trascrizione di *ABCB* (Franzellitti e Fabbri 2013). Il propranololo interferisce sull'espressione del prodotto genico in esame in maniera diversa a seconda dei recettori con cui interagisce; esso infatti, bloccando gli effetti dei relativi agonisti, diminuisce i livelli intracellulari di cAMP, nel momento in cui si lega ai recettori β -adrenergici, mentre li aumenta, legandosi ai recettori per la serotonina (Franzellitti *et al.*, 2011).

La sotto espressione di *ABCB* rilevata in emociti trattati con concentrazioni intermedie di propranololo (10^{-7} M, 10^{-6} M e 10^{-5} M) è in accordo, dunque, con l'azione β -bloccante del farmaco; mentre la sovra espressione ritrovata a 10^{-4} M può essere dovuta alla concentrazione troppo elevata di tale inquinante, per cui esso agisce in maniera aspecifica su diversi recettori.

Il propranololo agisce da modulatore dell'espressione non solo del prodotto genico *ABCB* ma anche di *ABCC*. Si nota (Fig. 4.9), infatti, come all'aumentare della concentrazione del farmaco testato, *ABCC* passa da una condizione di sotto espressione ad una di sovra espressione. Il meccanismo di regolazione che porta all'espressione di MRP non è stato, tuttavia, ancora chiarito. Ulteriori studi dovrebbero essere finalizzati a tale scopo.

L'andamento dell'attività MXR totale indotto dalla carbamazepina presenta un significativo decremento del substrato fluorescente alle concentrazioni più alte (10^{-6} M, 10^{-5} M e 10^{-4} M), indice di un'elevata attività di trasporto delle proteine MXR (Fig. 4.7). Tale andamento è dovuto principalmente all'azione di Pgp, in quanto il prodotto genico *ABCB*, ad elevate concentrazioni, è significativamente sovra espresso, contrariamente *ABCC* è sotto espresso (Fig. 4.10). Il meccanismo farmacologico mediante il quale la carbamazepina esibisce il suo effetto terapeutico non è ancora chiaro, sebbene sia certo il suo ruolo di modulazione sui canali del sodio. Precedenti studi (Martin-Diaz *et al.*, 2009) hanno suggerito che la carbamazepina interagisce direttamente, o indirettamente, con l'enzima adenilato ciclasi, portando ad una diminuzione dei livelli di cAMP nelle cellule. Nel medesimo studio è stata ritrovata una forte relazione tra cAMP e i livelli di

espressione dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC*, per cui a basse concentrazioni di cAMP sono stati identificati bassi livelli di espressione dei prodotti genici in esame. Ciò conferma i dati ottenuti in questo lavoro di Tesi relativamente all'espressione di *ABCC*, ma non di *ABCB*, il quale appare, genericamente, sovra espresso. Tale discordanza di risultati può essere dovuta all'azione della carbamazepina su diversi bersagli cellulari.

La fluoxetina, inibitore del reuptake della serotonina, non apporta, invece, alcun cambiamento all'attività di trasporto se non alla concentrazione più alta (Fig. 4.8), concentrazione che influisce, anche se lievemente, sulla vitalità cellulare (Fig. 4.12). Tale andamento non è, tuttavia, conforme con i livelli di espressione dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC* (Fig. 4.11), i quali, alla concentrazione più elevata, non mostrano differenze statisticamente significative rispetto al controllo. I risultati ottenuti sono in contrasto con quanto riportato da Franzellitti *et al.* (2013), i quali hanno ritrovato, a concentrazioni ambientali (0.3 ng/L), un effetto della fluoxetina sui livelli di espressione di *ABCB*. Secondo lo studio di Franzellitti *et al.* (2013), questo contaminante, inibendo il reuptake di serotonina, favorisce un aumento della concentrazione del neurotrasmettitore, il quale si lega ai propri recettori di membrana, recettori accoppiati a proteine G inibitorie (G_i). L'attivazione di G_i media l'inibizione dell'enzima adenilato ciclasi con conseguente riduzione dei livelli intracellulari di cAMP, determinando una diminuzione dei livelli di espressione di *ABCB*. Questa divergenza di risultati potrebbe essere giustificata ipotizzando che la fluoxetina agisca sugli emociti di *Mytilus galloprovincialis* principalmente a concentrazioni ambientali, concentrazioni molto più basse rispetto a quelle prese in considerazione in questo lavoro di Tesi.

In conclusione da questo lavoro di Tesi si evince che la fluoxetina non ha alcun effetto sull'attività MXR totale, mentre il propranololo e la carbamazepina alterano tale sistema, agendo sui livelli di espressione dei prodotti genici *ABCB* e *ABCC*, codificanti per i trasportatori attivi Pgp e MRP. L'analisi dei profili trascrizionali ha dimostrato che la proteina predominante nell'efflusso di tali contaminanti è la P-glicoproteina, in quanto essa presenta profili di espressione speculari all'andamento dell'attività MXR totale indotto dal propranololo e dalla carbamazepina. Questi risultati sono, però, in contrasto con i dati ottenuti dalle analisi su cellule trattate con inibitori modello le quali attestano uno scarso contributo di Pgp nell'efflusso di xenobiotici. Tale discordanza può

essere spiegata considerando che gli inibitori selettivi utilizzati sono inibitori modello per i mammiferi, è dunque plausibile che tali composti non agiscano in maniera così selettiva sulle cellule di mitilo, pertanto dovrebbero essere effettuati ulteriori studi per determinarne la validità sui questi organismi.

Inoltre, i farmaci in esame possono agire come modulatori dell'espressione dei prodotti genici esaminati, in quanto i loro bersagli terapeutici sono mediatori del sistema di trasduzione cAMP/PKA dipendente coinvolto nella regolazione della trascrizione di almeno una delle due proteine di trasporto analizzate (Franzellitti e Fabbri 2013), ma allo stesso tempo, questi possono essere essi stessi substrati dei trasportatori MXR così come accade nell'uomo, dove tale meccanismo è implicato nella chemioresistenza di alcune forme tumorali (Bard, 2000). E', quindi, ipotizzabile che le variazioni dell'attività MXR osservate in questa Tesi siano il risultato combinato dell'azione dei farmaci in esame come modulatori trascrizionali e come substrati.

Gli effetti osservati di questi composti farmaceutici su un meccanismo di citoprotezione ad ampio spettro come il sistema MXR, possono influenzare l'abilità dei mitili nell'elaborare strategie di difesa e di adattamento ad altri inquinanti nell'ambiente naturale. Questi e numerosi altri effetti a lungo termine riportati in letteratura indicano che il rilascio di farmaci ad uso umano o veterinario nell'ambiente necessita di essere più ampiamente studiato e controllato.

REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

- Ashton, D., Hilton, M., & Thomas, K. V. (2004). Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Science of the Total Environment*, 333(1), 167-184.
- Banni, M., Negri, A., Mignone, F., Boussetta, H., Viarengo, A., & Dondero, F. (2011). Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. *PLoS One*, 6(5), e18904.
- Bard, S. M. (2000). Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology*, 48(4), 357-389.
- Bringolf, R. B., Heltsley, R. M., Newton, T. J., Eads, C. B., Fraley, S. J., Shea, D., & Cope, W. G. (2010). Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6), 1311-1318.
- Brooks, B. W., Foran, C. M., Richards, S. M., Weston, J., Turner, P. K., Stanley, J. K., ... & La Point, T. W. (2003). Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicology letters*, 142(3), 169-183.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., ... & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611-622.
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M., Llompart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., ... & Ternes, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant. *Water research*, 38(12), 2918-2926.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), 156-159.

- Ciacci, C., Barmo, C., Fabbri, R., Canonico, B., Gallo, G., & Canesi, L. (2011). Immunomodulation in *Mytilus galloprovincialis* by non-toxic doses of hexavalent chromium. *Fish & shellfish immunology*, *31*(6), 1026-1033.
- Ciocan, C. M., Cubero-Leon, E., Minier, C., & Rotchell, J. M. (2011). Identification of reproduction-specific genes associated with maturation and estrogen exposure in a marine bivalve *Mytilus edulis*. *PloS one*, *6*(7), e22326.
- Cleuvers, M. (2005). Initial risk assessment for three β -blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere*, *59*(2), 199-205.
- Cornwall, R., Toomey, B. H., Bard, S., Bacon, C., Jarman, W. M., & Epel, D. (1995). Characterization of multixenobiotic/multidrug transport in the gills of the mussel *Mytilus californianus* and identification of environmental substrates. *Aquatic Toxicology*, *31*(4), 277-296.
- Couper, J. M., & Leise, E. M. (1996). Serotonin injections induce metamorphosis in larvae of the gastropod mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *The Biological Bulletin*, *191*(2), 178-186.
- Covelli, A. (1996). [SDZ PSC 833: a novel modulator of MDR]. *Tumori*, *83*(5 Suppl), S21-4.
- Cubero-Leon, E., Ciocan, C. M., Minier, C., & Rotchell, J. M. (2012). Reference gene selection for qPCR in mussel, *Mytilus edulis*, during gametogenesis and exogenous estrogen exposure. *Environmental Science and Pollution Research*, *19*(7), 2728-2733.
- Cunha, E. M., & Machado, J. (2001). Parturition in *Anodonta cygnea* induced by selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Canadian Journal of Zoology*, *79*(1), 95-100.
- Daoud, R., Kast, C., Gros, P., & Georges, E. (2000). Rhodamine 123 binds to multiple sites in the multidrug resistance protein (MRP1). *Biochemistry*, *39*(50), 15344-15352.

- Della Torre, C., Bocci, E., Focardi, S. E., & Corsi, I. (2014). Differential ABCB and ABCC gene expression and efflux activities in gills and hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* and their involvement in cadmium response. *Marine environmental research*, *93*, 56-63.
- Dondero, F., Piacentini, L., Banni, M., Rebelo, M., Burlando, B., & Viarengo, A. (2005). Quantitative PCR analysis of two molluscan metallothionein genes unveils differential expression and regulation. *Gene*, *345*(2), 259-270.
- Dzialowski, E. M., Turner, P. K., & Brooks, B. W. (2006). Physiological and reproductive effects of beta adrenergic receptor antagonists in *Daphnia magna*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, *50*(4), 503-510.
- Fent, K. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology letters*, *140*, 353-365. 362 (3), 329–340.
- Fent, K., Weston, A. A., & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology*, *76*(2), 122-159.
- Ferrari, B., Paxeus, N., Giudice, R. L., Pollio, A., & Garric, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *55*(3), 359-370.
- Fong, P. P. (1998). Zebra mussel spawning is induced in low concentrations of putative serotonin reuptake inhibitors. *The Biological Bulletin*, *194*(2), 143-149.
- Foran, C. M., Weston, J., Slattery, M., Brooks, B. W., & Huggett, D. B. (2004). Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *46*(4), 511-517.
- Franzellitti, S., & Fabbri, E. (2013). Cyclic-AMP mediated regulation of ABCB mRNA expression in mussel haemocytes. *PloS one*, *8*(4), e61634.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Capolupo, M., Du, B., Haddad, S. P., Chambliss, C. K., ... & Fabbri, E. (2014). An exploratory investigation of various modes of action and

- potential adverse outcomes of fluoxetine in marine mussels. *Aquatic Toxicology*, *151*, 14-26.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., & Fabbri, E. (2013). The mode of action (MOA) approach reveals interactive effects of environmental pharmaceuticals on *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, *140*, 249-256.
- Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., & Fabbri, E. (2011). The β -blocker propranolol affects cAMP-dependent signaling and induces the stress response in Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, *101*(2), 299-308.
- Fu, D., Bebawy, M., Kable, E. P., & Roufogalis, B. D. (2004). Dynamic and intracellular trafficking of P-glycoprotein-EGFP fusion protein: Implications in multidrug resistance in cancer. *International journal of cancer*, *109*(2), 174-181.
- Galgani, F., Cornwall, R., Toomey, B. H., & Epel, D. D. (1996). Interaction of environmental xenobiotics with a multixenobiotic defense mechanism in the bay mussel *Mytilus galloprovincialis* from the coast of California. *Environmental toxicology and chemistry*, *15*(3), 325-331.
- Gibson, U. E., Heid, C. A., & Williams, P. M. (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome research*, *6*(10), 995-1001.
- Gros, M., Petrović, M., & Barceló, D. (2006). Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*, *70*(4), 678-690.
- Grujić, S., Vasiljević, T., & Laušević, M. (2009). Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography–ion trap–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1216*(25), 4989-5000.
- Hannon, J., & Hoyer, D. (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural brain research*, *195*(1), 198-213.

- Higgins, C. F. (2007). Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature*, *446*(7137), 749-757.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology*, (11), 1026-30.
- Hoyer, D., Hannon, J. P., & Martin, G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *71*(4), 533-554.
- Huggett, D. B., Brooks, B. W., Peterson, B., Foran, C. M., & Schlenk, D. (2002). Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (B-blockers) on aquatic organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *43*(2), 229-235.
- Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Barnouin, K., Kurz, G., & Keppler, D. (1996). Transport of glutathione, glucuronate, and sulfate conjugates by the MRP gene-encoded conjugate export pump. *Cancer Research*, *56*(5), 988-994.
- Juliano, R. L., & Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *455*(1), 152-162.
- Kim, J. W., Ishibashi, H., Yamauchi, R., Ichikawa, N., Takao, Y., Hirano, M., ... & Arizono, K. (2009). Acute toxicity of pharmaceutical and personal care products on freshwater crustacean (*Thamnocephalus platyurus*) and fish (*Oryzias latipes*). *The Journal of toxicological sciences*, *34*(2), 227-232.
- Kim, J. W., Jang, H. S., Kim, J. G., Ishibashi, H., Hirano, M., Nasu, K., ... & Arizono, K. (2009). Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in surface water from Mankyung River, South Korea. *Journal of Health Science*, *55*(2), 249-258.
- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P. G., & Park, J. (2007). Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major

- sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, 33(3), 370-375.
- Kurelec, B. (1992). The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 22(1), 23-43.
- Kurelec, B. (1995). Inhibition of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms: ecotoxic consequences. *Science of the total environment*, 171(1), 197-204.
- Kurelec, B., Krča, S., Pivčević, B., Ugarković, D., Bachmann, M., Imsiecke, G., & Müller, W. E. (1992). Expression of P-glycoprotein gene in marine sponges. Identification and characterization of the 125 kDa drug-binding glycoprotein. *Carcinogenesis*, 13(1), 69-76.
- Lajeunesse, A., Gagnon, C., & Sauvé, S. (2008). Determination of basic antidepressants and their N-Desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80(14), 5325-5333.
- Lebedeva, I. V., Pande, P., & Patton, W. F. (2011). Sensitive and specific fluorescent probes for functional analysis of the three major types of mammalian ABC transporters. *PloS one*, 6(7), e22429.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., & Cole, S. P. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and applied pharmacology*, 204(3), 216-237.
- Lister, A., Regan, C., Van Zwol, J., & Van Der Kraak, G. (2009). Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation. *Aquatic toxicology*, 95(4), 320-329.
- Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D., & Bates, S. E. (2001). From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 58(7), 931-959.

- Liu, Q. T., Williams, T. D., Cumming, R. I., Holm, G., Hetheridge, M. J., & Murray-Smith, R. (2009). Comparative aquatic toxicity of propranolol and its photodegraded mixtures: algae and rotifer screening. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2622-2631.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Luckenbach, T., & Epel, D. (2008). ABCB-and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(6), R1919-R1929.
- Luckenbach, T., Corsi, I., & Epel, D. (2004). Fatal attraction: synthetic musk fragrances compromise multixenobiotic defense systems in mussels. *Marine environmental research*, 58(2), 215-219.
- Lüring, M. F. L. L. W., Sargant, E., & Roessink, I. (2006). Life-history consequences for *Daphnia pulex* exposed to pharmaceutical carbamazepine. *Environmental toxicology*, 21(2), 172-180.
- Martin-Diaz, L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., & Fabbri, E. (2009). Effects of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarkers and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 94(3), 177-185.
- McEneff, G., Barron, L., Kelleher, B., Paull, B., & Quinn, B. (2014). A year-long study of the spatial occurrence and relative distribution of pharmaceutical residues in sewage effluent, receiving marine waters and marine bivalves. *Science of the Total Environment*, 476, 317-326.
- Mennigen, J. A., Stroud, P., Zamora, J. M., Moon, T. W., & Trudeau, V. L. (2011). Pharmaceuticals as neuroendocrine disruptors: lessons learned from fish on Prozac. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 14(5-7), 387-412.

- Metcalf, C. D., Miao, X. S., Koenig, B. G., & Struger, J. (2003). Distribution of acidic and neutral drugs in surface waters near sewage treatment plants in the lower Great Lakes, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(12), 2881-2889.
- Mimeault, C., Woodhouse, A. J., Miao, X. S., Metcalf, C. D., Moon, T. W., & Trudeau, V. L. (2005). The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology*, 73(1), 44-54.
- Montezinho, L. P., Mørk, A., Duarte, C. B., Penschuck, S., Geraldes, C. F., & Castro, M. M. C. (2007). Effects of mood stabilizers on the inhibition of adenylate cyclase via dopamine D2-like receptors. *Bipolar disorders*, 9(3), 290-297.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1), 55-63.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology Series*, 17-17.
- Nakamura, Y., Yamamoto, H., Sekizawa, J., Kondo, T., Hirai, N., & Tatarazako, N. (2008). The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere*, 70(5), 865-873.
- Nikolaou, A., Meric, S., & Fatta, D. (2007). Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(4), 1225-1234.
- Owen, S. F., Giltrow, E., Huggett, D. B., Hutchinson, T. H., Saye, J., Winter, M. J., & Sumpter, J. P. (2007). Comparative physiology, pharmacology and toxicology of β -blockers: mammals versus fish. *Aquatic toxicology*, 82(3), 145-162.

- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9), e36-e36.
- Riout, D., Pasquier, J., Boulangé-Lecomte, C., Poret, A., Abbas, I., Marin, M., ... & Le Foll, F. (2014). The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. *Aquatic Toxicology*, 153, 98-109.
- Rohlf, C., & Glazer, R. I. (1995). Regulation of multidrug resistance through the cAMP and EGF signalling pathways. *Cellular signalling*, 7(5), 431-443.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning* (Vol. 1, No. 7.58). New York: Cold spring harbor laboratory press.
- Santos, L. H., Araújo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., & Montenegro, M. C. B. S. M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of hazardous materials*, 175(1), 45-95.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Schultz, M. M., Painter, M. M., Bartell, S. E., Logue, A., Furlong, E. T., Werner, S. L., & Schoenfuss, H. L. (2011). Selective uptake and biological consequences of environmentally relevant antidepressant pharmaceutical exposures on male fathead minnows. *Aquatic Toxicology*, 104(1), 38-47.
- Smital, T., Sauerborn, R., Pivčević, B., Krča, S., & Kurelec, B. (2000). Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 126(2), 175-186.

- SRC, 2007. SRC PhysProp Database, Syracuse Research Corporation. 07/2007. Available from: <http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm>.
- Stolarczyk, E. I., Reiling, C. J., & Paumi, C. M. (2011). Regulation of ABC transporter function via phosphorylation by protein kinases. *Current pharmaceutical biotechnology*, 12(4), 621.
- Svensson, S., Särngren, A., & Förlin, L. (2003). Mussel blood cells, resistant to the cytotoxic effects of okadaic acid, do not express cell membrane p-glycoprotein activity (multixenobiotic resistance). *Aquatic toxicology*, 65(1), 27-37.
- Ternes, T. A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water research*, 32(11), 3245-3260.
- Ternes, T. A., Hirsch, R., Mueller, J., & Haberer, K. (1998). Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and β 2-sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 362(3), 329-340.
- Thacker, P. D. (2005). Pharmaceutical data elude researchers. *Environmental science & technology*, 39(9), 193A-194A.
- Thomas, K. V., & Hilton, M. J. (2004). The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 49(5), 436-444.
- Tierney, A. J. (2001). Structure and function of invertebrate 5-HT receptors: a review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 128(4), 791-804.
- Triebkorn, R., Casper, H., Scheil, V., & Schwaiger, J. (2007). Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibric acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(4), 1405-1416.
- Uhler, G.C., Huminski, P.T., Les, F.T., Fong, P.P. (2000). Cilia-driven rotational behavior in gastropod (*Physa elliptica*) embryos induced by serotonin and

- putative selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Journal of experimental*, 286, 414-421
- Van der Kolk, D. M., De Vries, E. G., Koning, J. A., van den Berg, E., Müller, M., & Vellenga, E. (1998). Activity and expression of the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2 in acute myeloid leukemia cells, tumor cell lines, and normal hematopoietic CD34+ peripheral blood cells. *Clinical Cancer Research*, 4(7), 1727-1736.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, 3(7), research0034.
- Vasskog, T., Anderssen, T., Pedersen-Bjergaard, S., Kallenborn, R., & Jensen, E. (2008). Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. *Journal of Chromatography A*, 1185(2), 194-205.
- Vasskog, T., Berger, U., Samuelsen, P. J., Kallenborn, R., & Jensen, E. (2006). Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway. *Journal of Chromatography A*, 1115(1), 187-195.
- Wille, K., Claessens, M., Rappé, K., Monteyne, E., Janssen, C. R., De Brabander, H. F., & Vanhaecke, L. (2011). Rapid quantification of pharmaceuticals and pesticides in passive samplers using ultra high performance liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(51), 9162-9173.
- Zaja, R., Klobučar, G. I., Klobučar, R. S., Hackenberger, B. K., & Smital, T. (2006). Haemolymph as compartment for efficient and non-destructive determination of P-glycoprotein (Pgp) mediated MXR activity in bivalves. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 143(1), 103-112.

Zaja, R., Munić, V., Klobučar, R. S., Ambriović-Ristov, A., & Smital, T. (2008). Cloning and molecular characterization of apical efflux transporters (ABCB1, ABCB11 and ABCC2) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic toxicology*, 90(4), 322-332.