

ALMA MATER STUDIORUM UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

**Alterazione di risposte fisiologiche nei mitili *Mytilus galloprovincialis*
esposti a residui ambientali di farmaci che interferiscono con i
meccanismi serotoninergici**

Relatore

***Prof.ssa* Elena Fabbri**

Presentata da

Federica Inzolia

Correlatore

***Dott.ssa* Sara Buratti**

(II sessione)

Anno Accademico 2010/2011

Alla mia famiglia

Sommario

ABSTRACT	1
1 INTRODUZIONE	3
1.1 CONTAMINAZIONE AMBIENTALE DA FARMACI.....	5
1.2 METABOLISMO DEGLI XENOBIOTICI.....	7
1.2.1 Enzimi di fase I : Citocromo P450	8
1.2.2 Enzimi di fase II	11
1.3 STRESS OSSIDATIVO.....	13
1.4 LISOSOMI E PEROSSIDAZIONE LIPIDICA	14
1.5 DANNO AL DNA	20
1.6 FLUOXETINA	21
1.7 PROPRANOLOLO	23
1.8 BIOINDICATORI E BIOMARKERS	24
1.8.1 I Bioindicatori.....	24
1.8.2 I Biomarkers.....	25
1.9 GLI ORGANISMI SENTINELLA UTILIZZATI	27
1.9.1 Struttura morfologica	27
1.9.2 Regolazione osmotica ed escrezione	29
1.9.3 Apparato digerente	29
1.9.4 Alimentazione e digestione.....	30
1.9.5 Apparato respiratorio.....	31
1.9.6 Apparato riproduttore.....	31
1.9.7 Apparato circolatorio	31
2 SCOPO DELLA TESI	33
3 MATERIALI E METODI	37
3.1 ESPOSIZIONE DEI MITILI AL TRATTAMENTO CON FLUOXETINA E PROPANOLOLO	39
3.2 NEUTRAL RED RETENTION ASSAY (NRRA)	40
3.3 ACCUMULO DEI LIPIDI NEUTRI	40
3.3.1 Preparazione dei vetrini	40
3.3.2 Analisi d'immagine dei vetrini.....	41
3.4 ACCUMULO DELLE LIPOFUSCINE	41
3.4.1 Preparazione dei vetrini	41
3.4.2 Analisi d'immagine dei vetrini.....	42

3.5 RAPPORTO LISOSOMI/CITOPLASMA	42
3.5.1 Preparazione dei vetrini	42
3.5.2 Analisi d'immagine dei vetrini.....	42
3.6 SAGGI ENZIMATICI	42
3.6.1 Preparazione dei campioni per l'analisi dell'attività di EROD e DBF e per la valutazione del danno al DNA..	42
3.6.2 Determinazione dell'attività dell'etossiresorufina-o-deetilasi (EROD)	43
3.6.3 Determinazione dell'attività della dibenzilfluoresceina dealchilasi (DBF)	44
3.6.4 Determinazione del danno al DNA.....	44
3.6.5 Preparazione dei campioni per l'analisi dell'attività di Catalasi e GST	45
3.6.6 Determinazione dell'attività della Catalasi.....	45
3.6.7 Determinazione dell'attività della glutazione s-transferasi (GST).....	46
3.7 DETERMINAZIONE DELLA MALONDIALDEIDE (MDA)	47
3.8 DOSAGGIO DELLE PROTEINE	47
3.9 ANALISI STATISTICA	47
4 RISULTATI.....	49
4.1 NEUTRAL RED RETENTION ASSAY (NRRA)	51
4.2 RAPPORTO LISOSOMA/CITOPLASMA.....	52
4.3 ACCUMULO DEI LIPIDI NEUTRI	54
4.4 ACCUMULO DELLE LIPOFUSCINE	52
4.5 DETERMINAZIONE DELLA MALONDIALDEIDE (MDA).....	55
4.6 SAGGI ENZIMATICI	56
4.6.1 Determinazione dell'attività della glutazione s-transferasi (GST)	56
4.6.2 Determinazione dell'attività della Catalasi	57
4.6.3 Determinazione dell'attività dell'etossiresorufina-o-deetilasi (EROD).....	58
4.6.4 Determinazione dell'attività della dibenzilfluoresceina (DBF)	59
4.7 DETERMINAZIONE DEL DANNO AL DNA	60
4.8 CORRELAZIONE TRA I VARI BIOMARKER	61
5 DISCUSSIONE E CONCLUSIONE.....	63
6 BIBLIOGRAFIA.....	73

Abstract

La presenza di residui dei farmaci ad uso umano e veterinario nelle diverse matrici ambientali è in costante aumento. Una volta assunti, i farmaci sono escreti dagli organismi in forma nativa o come metaboliti, e attraverso gli scarichi urbani raggiungono i depuratori che li rimuovono solo in parte. Di conseguenza, i residui dei farmaci vengono ritrovati nei fiumi, nei laghi, fino alle acque marine costiere. Anche se presenti a basse concentrazioni (ng- μ g/L) nelle acque superficiali, i farmaci possono provocare effetti avversi negli organismi acquatici. Queste specie rappresentano involontari bersagli, tuttavia molti di essi possiedono molecole target simili a quelle dell'uomo, con i quali i farmaci interagiscono per indurre gli effetti terapeutici; in questo caso i farmaci ambientali possono causare effetti specifici ma indesiderati sulla fisiologia degli animali acquatici. Le interazioni possono essere anche non specifiche perché dovute agli effetti collaterali dei farmaci, ad esempio effetti ossidativi, con potenziali conseguenze negative su vertebrati ed invertebrati. In questo lavoro sono stati valutati i potenziali effetti indotti nei mitili dalla fluoxetina (farmaco antidepressivo) e dal propranololo (farmaco β -bloccante) con riferimento a quelli classificati come collaterali o irrilevanti nell'uomo. In particolare, è stata applicata un'ampia batteria composta di 10 biomarker. I mitili sono stati esposti per 7 giorni a fluoxetina o propranololo alla concentrazione di 0,3 ng/L, rappresentativa delle dosi inferiori dei due farmaci riscontrate in ambiente acquatico. Inoltre è stato valutato l'effetto della miscela delle due sostanze, considerando che i farmaci in ambiente sono sempre in combinazione con altri farmaci o altri contaminanti. I biomarker saggiati sono i seguenti:

- la stabilità delle membrane dei lisosomi, che informa circa lo stato di salute generale degli organismi;
- l'attività degli enzimi etossiresorufina-O-dietilasi e dibenzilfluoresceina, coinvolti nella detossificazione dopo esposizione a xenobiotici;
- l'attività degli enzimi catalasi e glutatione S-transferasi, parte del compartimento di difesa allo stress ossidativo;
- l'accumulo di malondialdeide, lipofuscine, lipidi neutri e il rapporto lisosomi/citoplasma, come indici di alterato metabolismo;
- l'integrità della molecola di DNA.

In ciascuno dei tre trattamenti si è osservata destabilizzazione delle membrane lisosomiali, accumulo di lipofuscine, lipidi neutri e aumento del rapporto lisosomi/citoplasma; alterazione dei meccanismi di difesa antiossidante e apparente inattivazione degli enzimi detossificanti. I farmaci considerati non hanno provocato danni al DNA. Nell'insieme i dati indicano lo sviluppo di una sindrome da stress e un peggioramento dello stato di salute dei mitili, a concentrazioni normalmente ritrovate in ambiente e tempi di esposizione ridotti.

CAP. 1

INTRODUZIONE

1.1 CONTAMINAZIONE AMBIENTALE DA FARMACI

I prodotti farmaceutici usati nella medicina umana e veterinaria comprendono approssimativamente 3000 composti differenti tra i quali antiinfiammatori (ibuprofene e aspirina), antibiotici (sulfonamidi e macrolidi), medicinali per la regolazione del colesterolo e dei lipidi (colifibrati e statine), β -bloccanti (propranololo), farmaci neuroattivi (caffeine, carbamazepina, fluoxetina e morfina), e molti altri (Daughton and Ternes, 1999; Fent *et al.*, 2006) con grandi differenze nella struttura chimica, funzione e meccanismo d'azione (Ternes, 2001; Jones *et al.*, 2004). I prodotti farmaceutici per usi umani sono escreti, o nella loro forma nativa o come metaboliti, negli scarichi urbani, sia domestici che ospedalieri, (Halling-Sorensen *et al.*,1998; Fent *et al.*,2006), e raggiungono gli impianti di scarico nel quale queste sostanze, non vengono rimosse (Cooper *et al.*,2008; Christensen, 2009). In seguito, lo smaltimento non corretto, porta al raggiungimento dei prodotti farmaceutici nel sistema acquatico naturale (Hernando *et al.*, 2006; Roberts and Bersuder, 2006).

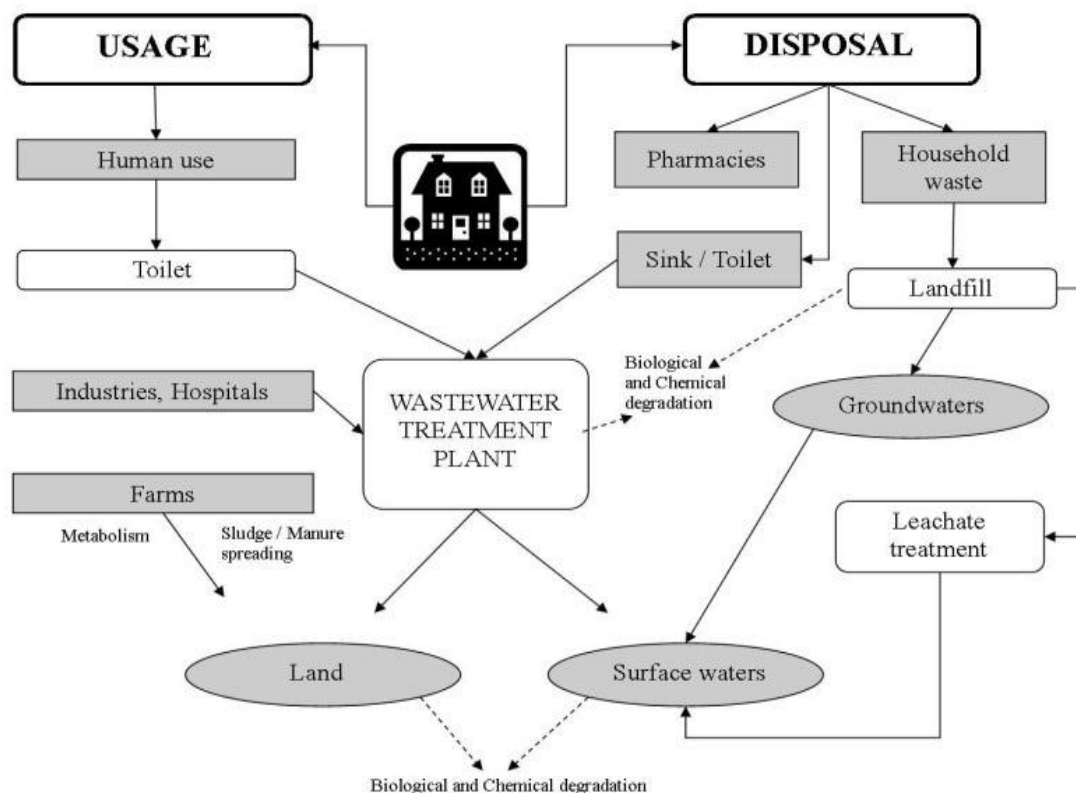


Fig. 1.1 La provenienza dei farmaci in ambiente (Nikolau *et al.*, 2007).

Tutto ciò provoca un rilascio continuo di farmaci nell'ambiente acquatico, aumentando la preoccupazione dell'opinione pubblica e scientifica in merito agli effetti di queste sostanze nell'ambiente (De Brander *et al.*, 2010). Un'altra fonte di immissione è rappresentata dallo smaltimento dei liquami derivati da allevamenti e da effluenti di impianti di acquacoltura, in cui l'utilizzo di farmaci veterinari è molto elevato.

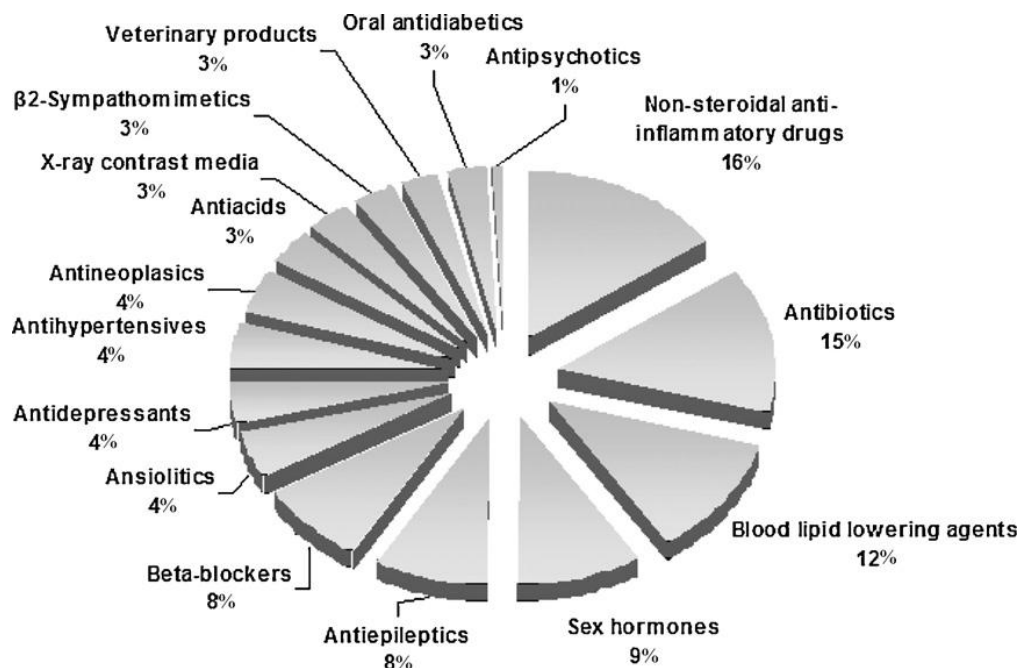


Fig. 1.2 Classi di farmaci rilevati in ambiente, espressi in percentuale. I dati sono raccolti da 134 articoli pubblicati tra il 1997 e il 2009 (Santos *et al.*, 2010).

I farmaci vengono continuamente riversati a basse concentrazioni (tra ng/L e μ g/L) con la possibilità di indurre negli organismi marini una tossicità a lungo termine (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Glassmeyer *et al.*, 2008). Queste concentrazioni basse sono state rilevate nelle matrici acquose come gli influenti (Gómez *et al.*, 2007; Vieno *et al.*, 2006) ed effluenti (Verenitch *et al.*, 2006; Koutsouba *et al.*, 2003) da impianti di depurazione, nelle acque superficiali come laghi, fiumi, estuari ecc.. (Moldovan, 2006; Calamari *et al.*, 2003), nelle acque costiere (Weigel *et al.*, 2002), acque sotterranee (Sacher *et al.*, 2001; Barnes *et al.*, 2008) e nelle acque potabili (Potera, 2000; Benotti *et al.*, 2009). Le informazioni geografiche esistenti sulle fonti di contaminazioni ambientale sono scarse e limitate. Paesi e regioni del mondo differiscono riguardo alla prevalenza di malattie, al diverso trattamento delle acque di scarico, dalle loro abitudini culturali o dai vincoli economici relative al mercato farmaceutico (Zuccato *et al.*, 2006). Tuttavia, sembra che le aree urbane siano le principali fonti di contaminazione a causa della prossimità di ospedali e di depuratori. Inoltre, il

contributo delle regioni rurali dove l'agricoltura, la zootecnia e acquacoltura rappresentano strumenti importanti per la vita, dovrebbe essere considerata altrettanto importante. Inoltre, nelle acque superficiali, i farmaci possono essere degradati attraverso diversi processi quali la fotolisi la cui efficienza dipende da fattori quali l'intensità di irraggiamento solare, la latitudine, stagione dell'anno e la presenza di organismi fotosintetici (Boreen *et al.*, 2003; Bartels *et al.*, 2007). Solitamente le acque reflue sono condotte negli impianti di depurazione che svolgono un ruolo chiave nell'ingresso dei prodotti farmaceutici nell'ambiente acquatico. La valutazione dell'efficienza di queste strutture è stata studiata in dettaglio mediante i tassi di rimozione dei farmaci che possono variare fino al 99%, confrontando gli affluenti e gli effluenti dei depuratori (Stumpf *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2006; Lindqvist *et al.*, 2005). È da sottolineare il fatto che non tutte le regioni o i paesi del mondo possiedono strutture di depurazione delle acque reflue, aumentando così le problematiche ambientali. Negli ospedali l'uso degli antibiotici specifici, farmaci chemioterapici e diagnostici richiedono un successivo trattamento delle acque reflue mirato a bloccare questi tipi di farmaci utilizzati esclusivamente negli ospedali (Daughton and Ternes, 1999; Kümmerer, 2001). Tuttavia, si deve essere consapevoli del fatto che se un farmaco particolare non viene rilevato in un effluente, non significa necessariamente che questo sia stato completamente rimosso. In alcune occasioni, potrebbe essere stato degradato dando origine a metaboliti che potrebbero successivamente contaminare le acque superficiali (Daughton and Ternes, 1999; Heberer, 2002; Zwiener *et al.*, 2001).

I prodotti farmaceutici sono sostanze esogene, organiche o inorganiche, naturali o sintetiche, capaci di indurre modificazioni funzionali in un organismo vivente attraverso un'azione fisica, chimica o fisico-chimica. Una volta introdotti nell'ambiente possono influenzare in modo analogo e con gli stessi obiettivi la fisiologia di vertebrati e invertebrati. Si sa molto poco degli effetti di queste molecole sui vertebrati, ancor meno sugli invertebrati. Per questo, anche ai fini di comprenderne la possibile tossicità, stabilire limiti ambientali ed operare per la messa in commercio di farmaci più ecocompatibili, è necessario acquisire maggiori informazioni.

1.2 METABOLISMO DEGLI XENOBIOTICI

Il metabolismo è definito come la somma delle reazioni chimiche che avvengono all'interno di una cellula vivente. Lo scopo del metabolismo è quello di mantenere l'omeostasi, ovvero mantenere l'ambiente interno relativamente stabile attraverso un'interazione di processi fisiologici. Gli xenobiotici sono sottoposti ad una conversione, causando la trasformazione del composto; questo

processo metabolico è chiamato biotrasformazione. La biotrasformazione può avvenire in varie parti del corpo come la pelle, gli organi respiratori ed escretori, in particolare il fegato che contiene un gran numero di enzimi in grado di biotrasformare gli xenobiotici. Gli enzimi coinvolti nella biotrasformazione sono chiamati ossidasi a funzione mista (MFO), comunemente noti come citocromo P450 (Kappas and Alvares, 1975). Il processo di biotrasformazione degli xenobiotici consiste in due fasi: Fase I e Fase II. La fase I di biotrasformazione è caratterizzata da reazioni di ossidazione, riduzione e idrolisi, mentre le reazioni di fase II reazioni di coniugazione. Le reazioni di ossidazione più rappresentative catalizzate dal citocromo P450 sono l'idrossilazione (di carbonio alifatico o aromatico), la dealchilazione (incluso atomi come O, S o N), la deaminazione, l'eossidazione, il trasferimento di un gruppo ossidativo e la deidrogenazione.

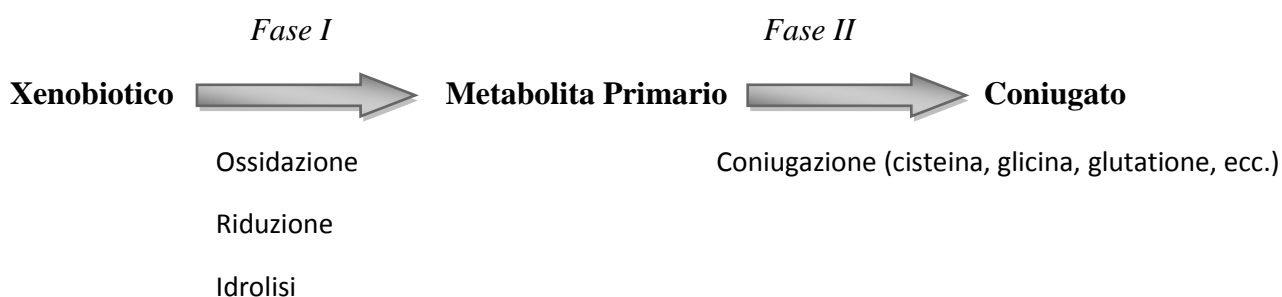


Fig. 1.3 Le due fasi della biotrasformazione (Ming-Ho Yu, 2005).

La molecola estranea lipofilica viene prima ossidata nella fase I di reazione, affinché il gruppo funzionale, come -OH, -NH₂, -COOH o -SH, venga introdotto nella molecola, formando un prodotto chiamato “metabolita primario”. La fase II, al contrario, è un processo di sintesi o coniugazione. In questa fase, il metabolita primario, proveniente dalla fase I della biotrasformazione o lo xenobiotico stesso, reagisce con una sostanza endogena formando un coniugato. In questa fase sono coinvolti processi di solfatazione, acetilazione, metilazione, glucuronidazione e coniugazione con glutatione (GSH) e aminoacidi. Alcuni xenobiotici sono lipofilici e vengono sottoposti ad entrambe le fasi di biotrasformazione, mentre altre sostanze possono essere metabolizzate anche in una sola fase (Ming-Ho Yu, 2005).

1.2.1 Enzimi di fase I : Citocromo P450

Il sistema NADPH-citocromo P450, comunemente chiamato sistema ossidasi a funzione mista (MFO), è il più importante sistema enzimatico coinvolto nella Fase I della biotrasformazione. Il

sistema del citocromo P450, è localizzato nel reticolo endoplasmatico liscio nelle cellule della maggior parte dei tessuti, ed è particolarmente abbondante nel fegato. Contrariamente alla maggior parte degli enzimi che catalizzano il metabolismo di un substrato con un meccanismo rapido ed efficiente, il sistema citocromo P450 contiene una serie di isoenzimi, forme multiple di un enzima che sono strutturalmente equivalenti ma cataliticamente diverse le une dalle altre, in grado di trasformare una varietà di substrati con meccanismi multipli, a volte in modo lento ed inefficiente. Le reazioni che questi isoenzimi catalizzano includono idrossilazione alifatica o aromatica, epossidazione di un doppio legame, N-ossidazione, sulfossidazione, dealchilazione, deaminazione, deidrogenazione, trasferimento di gruppi ossidativi e la scissione degli esteri (Wislocki *et al.*, 1980). Durante la reazione catalitica, la forma ossidata dell'atomo di ferro (Fe^{3+}), presente nel sito attivo del citocromo P450, si lega direttamente al substrato (XH). La riduzione di questo complesso enzima-substrato avviene con il trasferimento di un elettrone dal NADPH ad opera del NADPH-citocromo P450 reduttasi. Il complesso enzima-substrato ridotto (Fe^{2+}) si lega all'ossigeno molecolare (O_2) e viene ridotto ulteriormente da un secondo elettrone (presumibilmente donato dal NADH). Un atomo di O_2 si riduce ad H_2O mentre l'altro viene incorporato nel substrato producendo XOH, un idrossilato. Il complesso enzima-substrato-ossigeno si divide quindi in substrato ossidato, acqua e nella forma ossidata dell'enzima.

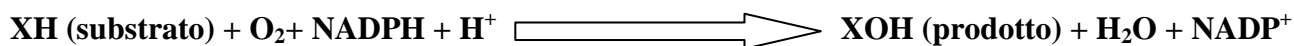
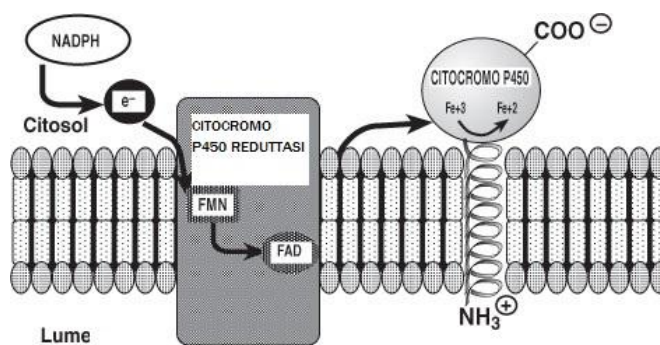
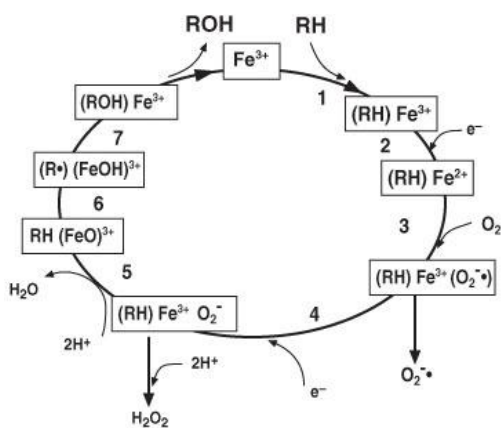


Fig. 1.4 Meccanismo d'azione delle ossigenasi a funzione mista.

Il monossido di carbonio (CO) si lega facilmente alla forma ridotta del citocromo formando un complesso con un assorbimento massimo a 450 nm (questa è l'origine del nome citocromo P450). La formazione del CO-complesso provoca l'inibizione dell'attività enzimatica e quindi del processo di ossidazione.



a)

b)

1.5 a) Ciclo catalitico del sistema monoossigenasico citocromo P450-dipendente. b) Trasporto degli elettroni dal NADPH al citocromo P450 catalizzato dall'enzima di membrana NADPH-citocromo P450 reductasi (Brown, M.O. and Tobar, V.G., 2004).

Come già accennato in precedenza, il sistema del citocromo P450 possiede una serie di isoenzimi, tra cui l'etossiresorufina-O-dietilasi (EROD) e la dibenzilfluoresceina dealchilasi (DBF) oggetto di questa tesi. L'EROD (EC 1.14.14.1) è uno dei biomarker di esposizione maggiormente utilizzati per osservare le risposte fisiologiche nei pesci e negli invertebrati a seguito dell'esposizione di composti xenobiotici (Stegeman and Hahn, 1994; Bucheli and Fent, 1995). L'attività di questo enzima è rilevata anche negli organismi non esposti ad agenti estranei, e aumenta significativamente dopo l'esposizione agli xenobiotici (Stegeman and Lech, 1991). Gli eventi che portano alla induzione di questo enzima da parte di sostanze estranee all'organismo sono stati ampiamente studiati nei mammiferi (Poland and Bradfield, 1992; Nebert *et al.*, 1993; Okey *et al.*, 1994), e si ritiene che agiscano in modo simile anche nei pesci (Hahn and Karchner, 1995). L'induzione dell'EROD è mediata attraverso il legame degli xenobiotici ad un recettore arilico (AhR) citosolico e la sua attività catalitica può essere rilevata mediante la quantificazione della resorufina (Fig. 1.7), un composto idrossilato che si forma a seguito della dietilazione della 7-etossiresorufina (Pohl and Fouts, 1980).

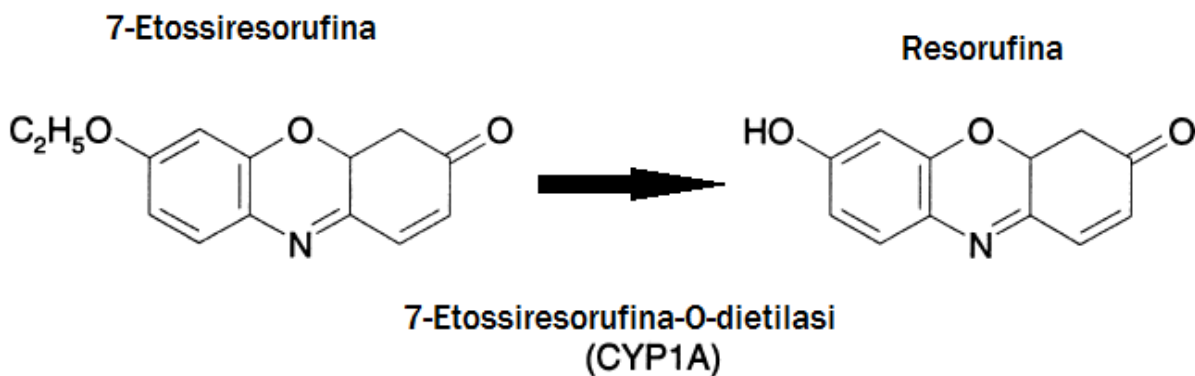


Fig. 1.6 Reazione di dietilazione della 7-etossiresorufina che porta alla formazione di resorufina. La reazione è mediata dalla etossiresorufina O-dietilasi (CYP1A) (Whyte *et al.*, 2000).

L'enzima DBF ha lo stesso meccanismo d'azione dell'EROD, e la sua attività viene determinata in laboratorio mediante la quantificazione della fluoresceina che si forma in seguito alla dealchilazione della dibenzilfluoresceina.

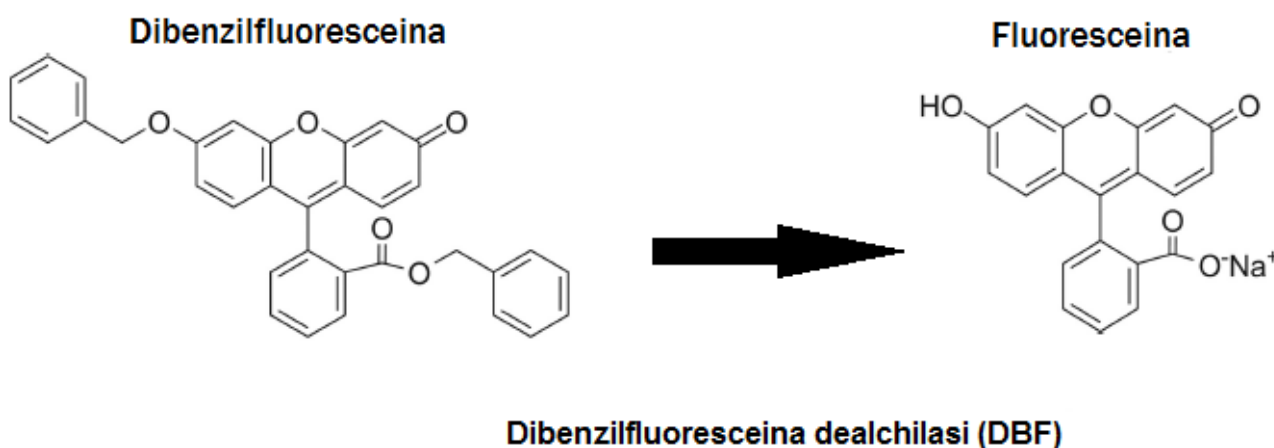


Fig. 1.7 Reazione di dealchilazione della dibenzilfluoresceina che porta alla formazione della fluoresceina. La reazione è mediata dalla dibenzilfluoresceina dealchilasi (DBF).

1.2.2 Enzimi di fase II

La seconda fase della biotrasformazione comporta la coniugazione dello xenobiotico originario o dei suoi metaboliti (provenienti dalla fase I) con un ligando endogeno. La coniugazione è una reazione di addizione in cui gruppi chimici polari o composti come zuccheri o aminoacidi sono covalentemente addizionati agli xenobiotici, fra cui anche i farmaci (Lech and Vodcnik, 1985).

Queste reazioni di coniugazione facilitano l'escrezione delle sostanze chimiche attraverso il legame con molecole polari, come ad esempio il glutatione (GSH) o l'acido glucuronico (GA) (Commandeur *et al.*, 1995; Mulder *et al.*, 1990). Alcuni composti xenobiotici possiedono i gruppi funzionali necessari per la trasformazione diretta da parte dal sistema enzimatico della fase II (come -COOH, -OH o -NH₂), mentre altri sono metabolizzati attraverso un processo integrato che coinvolge prima gli enzimi della fase I (George, 1994; Lech and Vodcnik, 1985; Sijm and Opperhuizen, 1989). Le enzimi di fase II sono molto importanti perché mantengono l'omeostasi detossificando ed eliminando numerosi xenobiotici. La via principale in cui sono coinvolti i composti elettrofili ed i metaboliti è la coniugazione con il GSH, mentre per i composti nucleofili la principale via è la coniugazione con il GA (George, 1994). La solfatazione è un processo che entra in competizione con la glucuronidazione per i metaboliti degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), ma è efficace solo a concentrazioni basse del substrato (George, 1994). Tra gli enzimi coinvolti nella Fase II del metabolismo degli xenobiotici c'è la glutatione S-transferasi (GST), oggetto di questa tesi. Sono note GST microsomiali, coinvolte nel metabolismo del glutatione e degli eicosanoidi e GST citosoliche, implicate nel metabolismo degli xenobiotici. Si tratta di proteine pressoché ubiquitarie che possono costituire anche il 3-10% delle proteine solubili nel citosol degli epatociti. Sono degli omodimeri costituiti da subunità di 25 kDa che presentano due domini principali:

- un dominio N-terminale ad α -elica molto conservato che lega il glutatione;
- un dominio C-terminale, anche'esso ad α -elica, molto variabile, che lega il substrato.

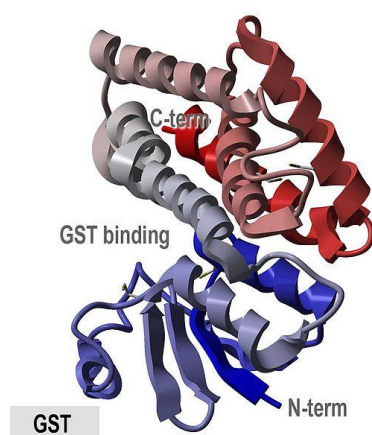


Fig. 1.8 Struttura della glutatione-S-transferasi (fonte: wikipedia.org).

Questo enzima catalizza le reazioni di coniugazione di xenobiotici aventi una regione elettrofila con il glutatione ridotto (GSH), un tripeptide formato da glicina, cisteina ed acido glutammico (Bonamassa, 2009).

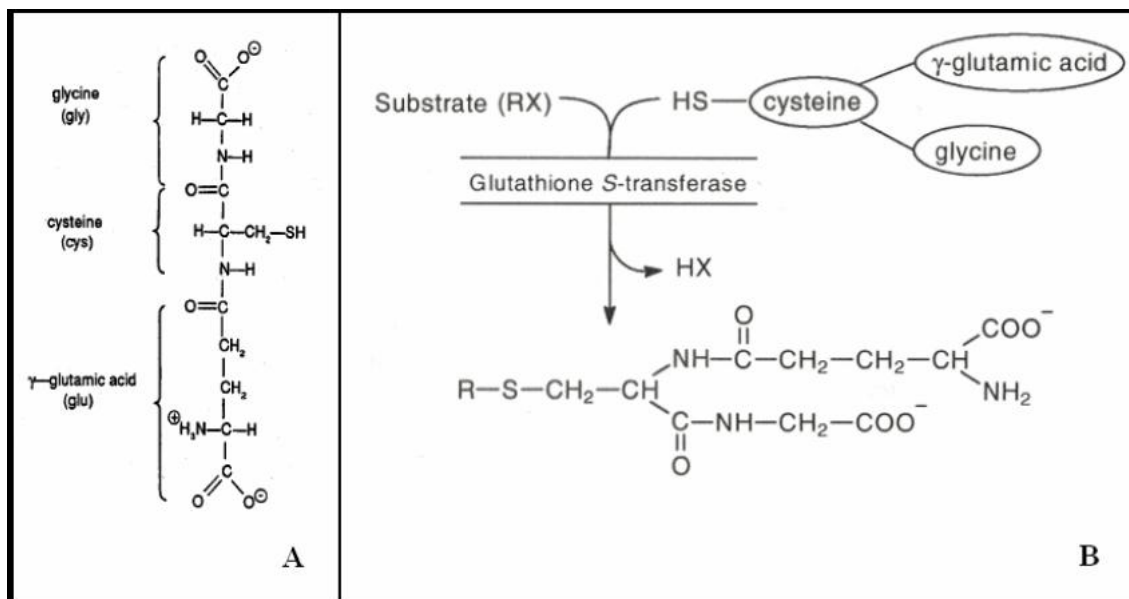
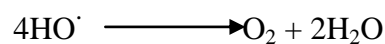


Figura 1.9 Il glutathione ridotto (A) e la reazione di coniugazione (B).

1.3 STRESS OSSIDATIVO

Molti xenobiotici o i loro metaboliti possono provocare stress ossidativo. La tossicità dell'ossigeno è definita come la causa degli effetti citotossici delle Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS), noti anche come intermedi reattivi dell'ossigeno, radicali liberi dell'ossigeno o ossidoradicali (Di Giulio *et al.*, 1989; Halliwell and Gutteridge, 1999; Winzer, 2001). Nelle reazioni del metabolismo aerobico l'utilizzo dell'ossigeno molecolare (O_2) comporta la produzione di piccole quantità del radicale anione superossido ($O_2^{\cdot -}$), del perossido di idrogeno (H_2O_2), e del radicale idrossile (HO^{\cdot}), potenti ossidanti capaci di reagire con macromolecole cellulari causando inattivazione di enzimi, perossidazione lipidica, danni al DNA, fino alla morte cellulare (Winston and Di Giulio, 1991). Nel ciclo di ossidoriduzione, il composto originario viene ridotto da una reduttasi NADPH-dipendente (come la citocromo P450 reduttasi) producendo uno xenobiotico radicale che dona il suo elettrone non condiviso all' O_2 producendo $O_2^{\cdot -}$ e lo xenobiotico originario. Così, ad ogni ciclo, si verificano due eventi potenzialmente dannosi: il composto riducente viene ossidato e viene prodotto un ossidoradicale (Winston and Di Giulio, 1991; Goepfar *et al.*, 1995). I sistemi di difesa degli organismi che si oppongono all'azione dei ROS includono enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi (SOD), la glutathione perossidasi-dipendente (GPOX), la glutathione reduttasi (GR) e infine la catalasi (CAT). La catalasi (EC 1.11.1.6), enzima oggetto di questa tesi, appartiene alla classe delle ossidoreduttasi, coinvolto nella detossificazione della cellula. Si tratta di una emoproteina con

struttura quaternaria costituita da 4 catene polipeptidiche, all'interno delle quali vi sono 4 gruppi ferrosi che permettono all'enzima di reagire con il perossido di idrogeno. Dovendo operare con molecole particolarmente reattive, la catalasi è un enzima insolitamente stabile: le quattro catene sono intrecciate e bloccano così l'intero complesso nella forma corretta. La catalasi ha il più elevato numero di turnover conosciuto tra gli enzimi conosciuti, pari a $4 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$ in quanto una singola molecola riesce a convertire fino a 5 milioni di molecole di perossido d'idrogeno al minuto, garantendo una risposta efficace nella difesa dell'organismo dallo stress ossidativo. La sua costante di Michaelis-Menten è relativamente alta: 1,1 M. Ciò significa che si tratta di un enzima relativamente difficile da saturare, ossia raggiunge la velocità massima di reazione solo ad elevate concentrazioni di perossido di idrogeno. La catalasi è collocata all'interno dei perossisomi, organuli cellulari nei quali avviene la produzione di H_2O_2 e catalizza la conversione del perossido di idrogeno in acqua e ossigeno:



Il perossido di idrogeno è un agente tossico per gli organismi viventi e fra gli altri effetti è in grado di generare danni a carico dei lipidi di membrana; perciò occorre una molecola molto efficiente per attuare la detossificazione. La misura dell'attività di questo enzima permette di individuare un eventuale stress ossidativo causato da agenti xenobiotici (Viarengo *et al.*, 2007).

1.4 LISOSOMI E PEROSSIDAZIONE LIPIDICA

I lisosomi sono organelli subcellulari circondati da una membrana semipermeabile contenenti numerosi enzimi idrolitici coinvolti in una serie di processi cellulari tra cui la digestione e la detossificazione (Moore, 1976; Pipe, 1993; Ferreira and Dolder, 2003). Essi contengono circa 50 tipi di enzimi idrolitici, comprese proteasi, nucleasi, glicosidasi, lipasi, fosfolipasi, fosfatasi e solfatasi. Tutti questi enzimi sono delle idrolasi acide che richiedono per un'attività ottimale un ambiente acido e il lisosoma crea questo ambiente mantenendo un pH di circa 5,0 al suo interno grazie ad una pompa protonica presente nella membrana lisosomiale che usa l'energia di idrolisi di ATP per pompare H^+ all'interno mantenendo così il lume ad un pH acido. Le idrolasi vengono prodotte nel reticolo endoplasmatico rugoso, passano all'apparato di Golgi e vengono inserite nelle vescicole lisosomiali che gemmano dall'apparato stesso (lisosomi primari). In particolare le idrolasi lisosomiali e le proteine di membrana vengono sintetizzate nel reticolo endoplasmatico ruvido e trasportate attraverso l'apparato di Golgi *cis* al Golgi *trans*. Mentre passano attraverso il lume del Golgi *cis*, questi enzimi lisosomiali solubili vengono marcati con il mannosio-6-fosfato (M6P) per

consentire il riconoscimento da parte di recettori di membrana situati sul reticolo del Golgi trans. Le vescicole contenenti gli enzimi gemmano dal reticolo del Golgi trans e si fondono con gli endosomi tardivi. Il pH basso di questi, causa il distacco degli enzimi dai recettori di M6P che vengono riciclati verso l'apparato del Golgi per ulteriori cicli di trasporto. Negli endosomi tardivi, il fosfato è rimosso dal mannosio-6-fosfato assicurando ulteriormente che le idrolasi non ritornino all'apparato di Golgi con il recettore (Alberts *et al.*, 2004).

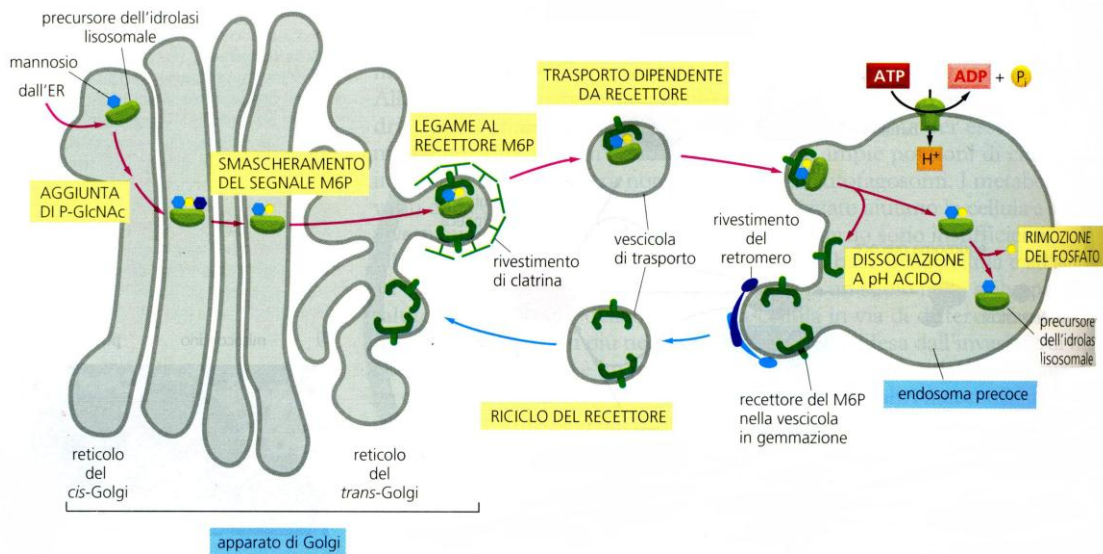


Fig. 1.10 Il trasporto di idrolasi lisosomiali di nuova sintesi ai lisosomi (fonte Alberts, B. *et al.*, 2004).

Le sostanze da digerire nei lisosomi arrivano almeno da tre vie:

- 1) endocitosi: le molecole endocitate sono portate inizialmente in vescicole chiamate endosomi precoci o primari che evolvono in altre più grandi chiamati endosomi tardivi; queste si fondono con i lisosomi primari, formando i lisosomi secondari dove il pH è basso e gli enzimi iniziano la demolizione del materiale endocitato.
- 2) autofagia: è un processo nel quale vengono eliminati parti obsolete della cellula stessa (ad esempio un mitocondrio invecchiato) circondate con una membrana che origina dal reticolo endoplasmatico costituendo l'autofagosoma, che si fonde quindi con un lisosoma primario formando nuovamente un lisosoma secondario;
- 3) fagocitosi: è un processo nel quale cellule specializzate fagocitano grosse particelle o microrganismi formando un fagosoma, che quindi si fonde con un lisosoma primario nel modo descritto per l'autofagosoma.

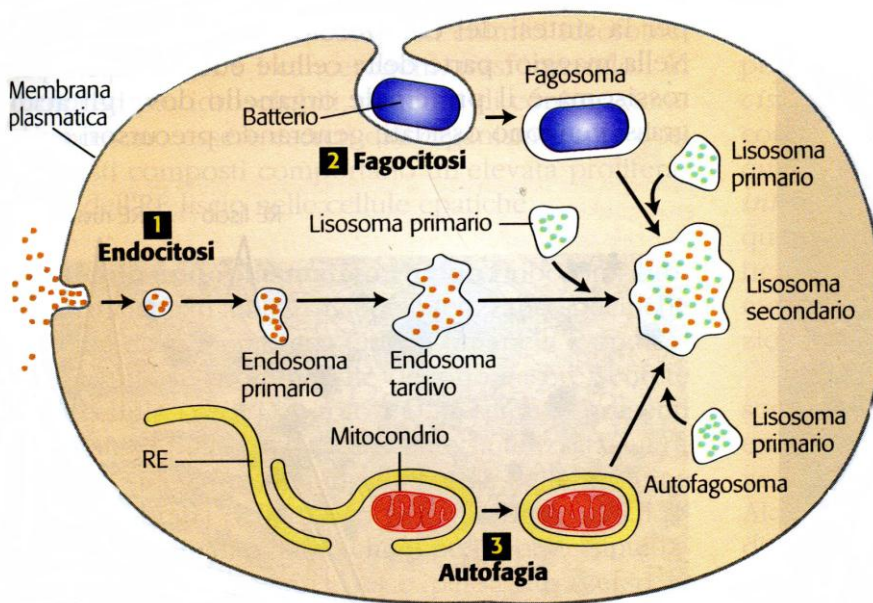


Fig. 1.11 Le 3 vie di degradazione dei lisosomi (fonte: Lodish *et al.*, 2009).

Gli effetti tossici degli inquinanti spesso dipendono dalla loro capacità di incrementare le specie reattive dell'ossigeno (ROS) nei vari compartimenti cellulari. Questo avviene o semplicemente tramite l'attivazione di processi che portano alla loro sintesi o tramite un'azione indiretta sugli enzimi di detossificazione diminuendo così le difese cellulari. Quando il livello di produzione dei ROS supera lo "scudo" antiossidante (catalasi, SOD, GST) presente nel citoplasma, i ROS entrano nei lisosomi dove queste difese non sono più presenti e le cellule subiscono uno stress ossidativo che causa la perossidazione lipidica sulle membrane destabilizzandole (Viarengo, 1989; Terman and Brunk, 2004; fig 1.12). I prodotti finali della perossidazione lipidica che si accumulano all'interno dei lisosomi sono le lipofuscine e i lipidi neutri. Le lipofuscine sono dei granuli costituiti da residui dell'ossidazione di proteine e lipidi, contenenti anche carboidrati e metalli (George and Viarengo, 1985; Viarengo and Nott, 1993; Terman and Brunk, 2004). Anche se le componenti delle lipofuscine possono essere variabili, esse non sono degradabili probabilmente a causa di peptidi legati alle aldeidi, che creano strutture insolubili. L'accumulo di questi pigmenti all'interno del sistema vacuolare dei lisosomi negli epatociti dei pesci o nelle cellule delle ghiandole digestive dei molluschi, rappresenta un indicatore del livello di stress ossidativo nelle cellule correlato alla perossidazione dei lipidi di membrana (Viarengo and Nott, 1993). Anche la determinazione dei livelli della malondialdeide (MDA) può essere utilizzata per valutare l'entità della perossidazione lipidica subita dalle cellule. Questo composto è un prodotto intermedio della perossidazione lipidica che viene generalmente degradato in modo rapido (Esterbauer, 1985). Tuttavia le lipofuscine

rappresentano il prodotto finale della perossidazione lipidica e il loro accumulo, facilmente rilevabile nelle cellule degli organismi stressati, tiene conto dell'intero processo di perossidazione.

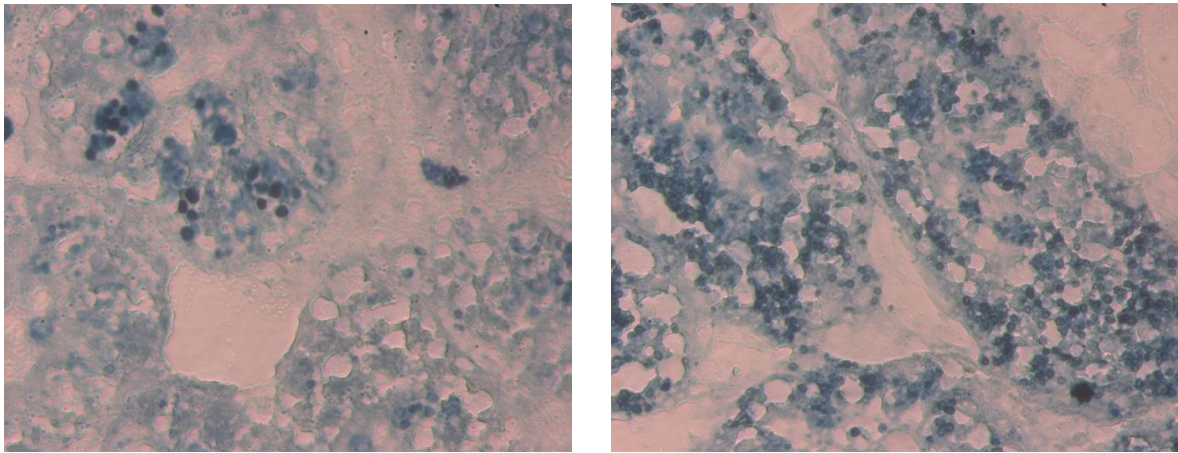


Fig.1.12 Accumulo di lipofuscine (granuli scuri) osservato in fettine di 10 μm di spessore di ghiandola digestiva di mitilo (a sinistra il controllo, a destra il campione esposto).

L'alterazione del contenuto in lipidi neutri nelle ghiandole digestive dei molluschi rappresenta un altro parametro utilizzabile per valutare l'inquinamento ambientale (Viarengo and Canesi, 1991; Regoli, 1992; Kagley *et al.*, 2003). Gli effetti degli inquinanti sono spesso associati ad un metabolismo squilibrato degli acidi grassi e all'accumulo di lipidi neutri del sistema vacuolare dei lisosomi (Lüllman-Rauch, 1979). La formazione di queste sostanze nelle cellule della ghiandola digestiva dei molluschi può essere descritta come una forma di lipidosi indotta dalle sostanze chimiche tossiche. Si verifica prima un accumulo di lipidi neutri nel citoplasma, che poi vengono fagocitati all'interno dei lisosomi.

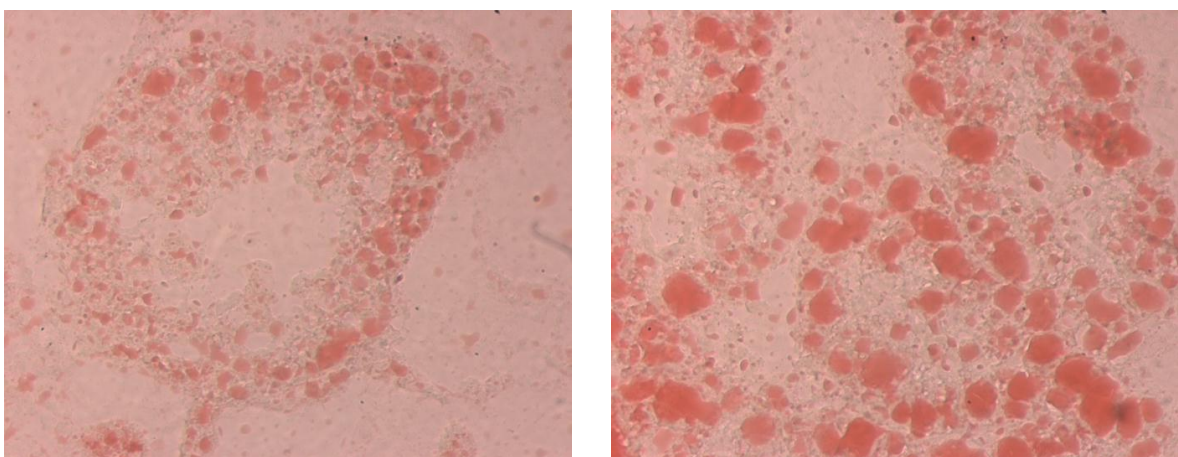


Fig. 1.13 Accumulo dei lipidi neutri (granuli arancioni) osservato in fettine di 10 μm di spessore di ghiandola digestiva di mitilo (a sinistra il controllo, a destra il campione esposto).

L'autofagia può essere valutata anche mediante l'analisi del rapporto tra il volume del citoplasma e quello dei lisosomi nelle cellule delle ghiandole digestive. Tutto ciò è dovuto al fatto che la

diminuzione drastica della stabilità della membrana lisosomiale è associata ad un significativo aumento dell'autofagia e questo col tempo può causare la perdita di citoplasma nelle cellule e di conseguenza un'alterazione del loro stato fisiologico (Lowe,1988; Lowe *et al.*, 1981; Moore, 1988; Moore and Clarke, 1982; Moore *et al.*, 2007).

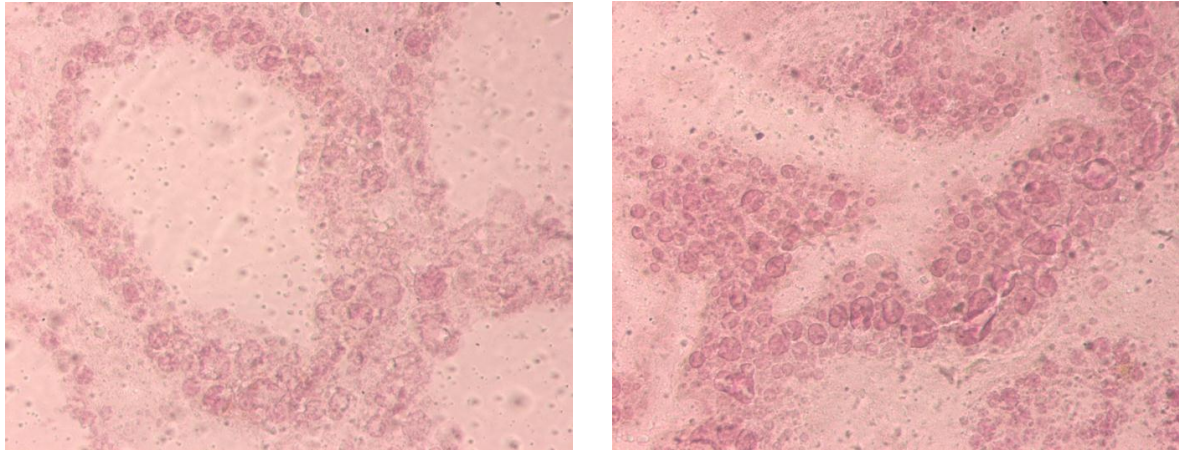


Fig. 1.14 Rapporto lisosoma/citoplasma osservato in fettine di 10 µm di spessore di ghiandola digestiva di mitilo (a sinistra il controllo, a destra il campione esposto).

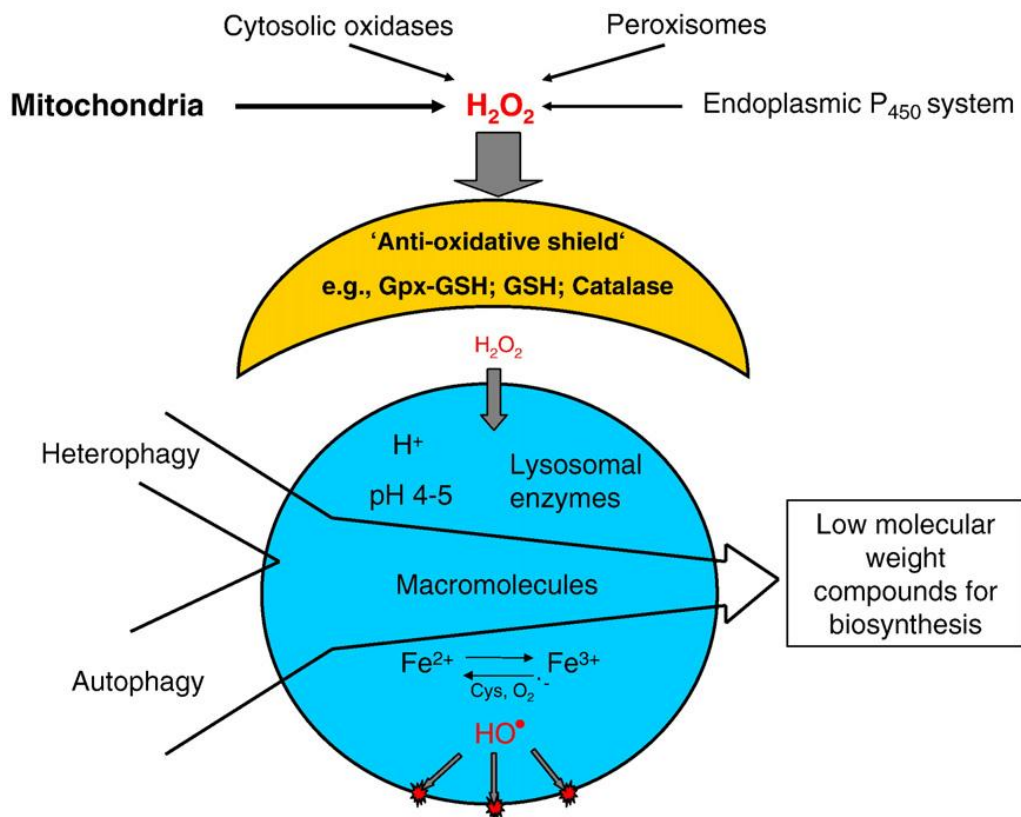


Fig.1.15 Destabilizzazione della membrana lisosomiale dovuta a perossidazione lipidica per effetto di HO• (Terman and Brunk, 2004).

La diminuzione della integrità delle membrane lisosomiali è direttamente correlata con la tossicità globale subita dalla cellula, il potenziale di sintesi proteica, la genotossicità e l'investimento nella crescita; nelle ostriche vi è una correlazione inversa con la vitalità delle larve (Moore et al., 2004).

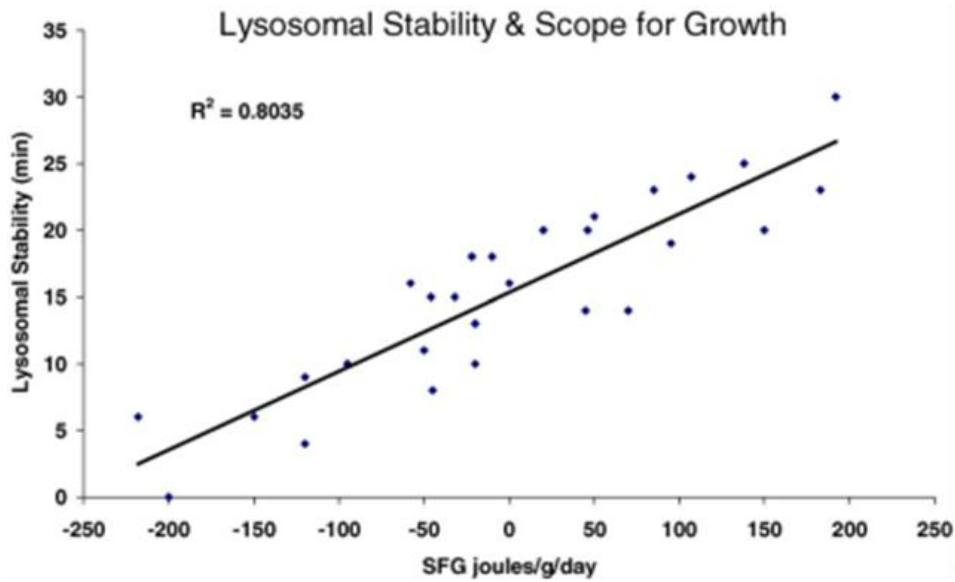


Fig. 1.16 la stabilità lisosomiale mostra una correlazione diretta con la vitalità delle larve (Moore et al., 2004)

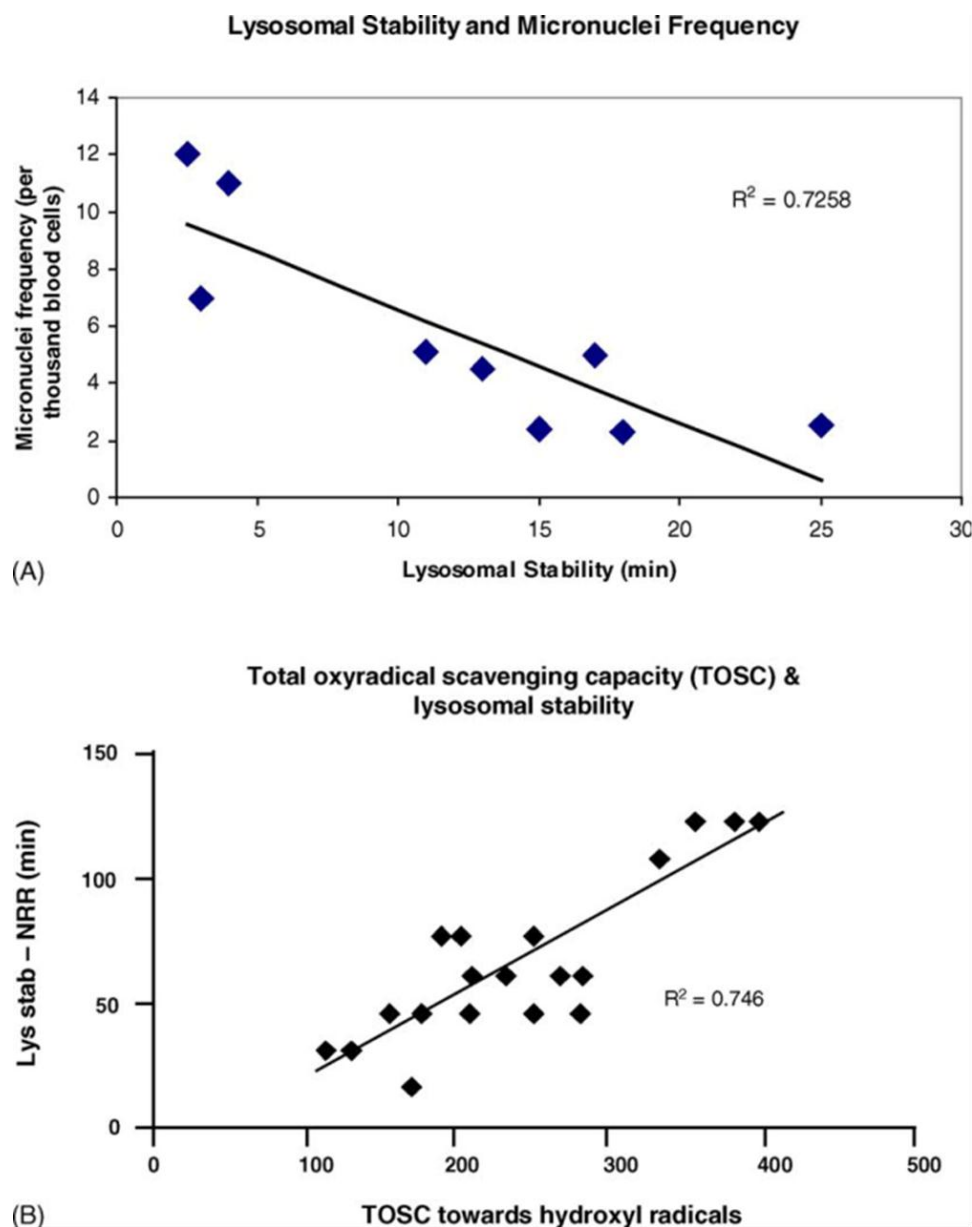


Fig. 1.17 Correlazione tra la stabilità lisosomiale con (A) genotossicità e (B) attività di enzimi antiossidanti (Moore *et al.*, 2004).

1.5 DANNO AL DNA

Il DNA è un'altra componente chiave del sistema cellulare particolarmente sensibile al danno ossidativo causato dalle specie reattive dell'ossigeno (Cerutti, 1985). La natura polianionica del DNA fornisce un substrato utile per facilitare l'interazione con i cationi metallici, e quindi la formazione di ROS in vicinanza di questi critici bersagli biologici (Halliwell and Aruoma, 1991). Inoltre, l'eterogeneità della molecola di DNA facilita l'attacco di OH \cdot tra le basi azotate e lo scheletro zuccherio-fosfato (Buxton *et al.*, 1988). I radicali ossidrilici reagiscono con le basi azotate

cinque volte più velocemente rispetto all'intera struttura degli acidi nucleici (Cadet *et al.*, 1997). Studi recenti hanno dimostrato che si possono formare 100 prodotti diversi a seguito del danno al DNA provocato dai ROS (Dizdaroglu, 1993). Le alterazioni del DNA indotte da agenti chimici e fisici includono la rottura del doppio o del singolo filamento, modificazioni delle basi azotate, e legami crociati DNA-DNA o DNA-proteine. La rottura dei filamenti, com'è stato detto precedentemente, può essere anche causata dall'interazione con i radicali dell'ossigeno, o per l'azione di enzimi di riparazione e, infine, come conseguenza di processo di apoptosi e necrosi (Eastman and Barry, 1992; Speit and Hartmann, 1995). L'integrità della struttura del DNA, inoltre, può essere alterata mediante la persistenza di questi inquinanti che si accumulano nei tessuti provocando genotossicità (Shugart, 1995) e di conseguenza mutagenesi (Siu *et al.*, 2004). Gli effetti degli inquinanti organici persistenti sul DNA sono di tipo cronico possono essere studiati in modo più appropriato nei tessuti degli animali prelevati dall'ambiente in cui questi inquinanti possono accumularsi e agire per anni (Viarengo *et al.*, 2007).

1.6 FLUOXETINA

La fluoxetina è il principio attivo del Prozac, un farmaco antidepressivo messo in commercio quasi venti anni fa dalla Eli Lilly, con lo scopo di inibire il reuptake della serotonina. Da allora la fluoxetina è diventata uno dei farmaci psicotropi maggiormente prescritti ed utilizzati per il trattamento della depressione, ma è anche somministrato per il disturbo ossessivo-compulsivo, disturbi nell'alimentazione, panico e ansia. La fluoxetina agisce principalmente sul sistema nervoso centrale inibendo selettivamente una proteina carrier nella membrana pre-sinaptica responsabile del re-uptake della serotonina; questa azione produce un aumento della concentrazione del neurotrasmettitore serotonina (5-idrossitriptamina [5-HT]), nella fessura sinaptica con il risultato di aumentare l'interazione del neurotrasmettitore stesso con i recettori post-sinaptici. La fluoxetina e altri inibitori selettivi del reuptake hanno una bassa affinità per i trasportatori di altri neurotrasmettitori (ad esempio la colina), e di conseguenza hanno una minore incidenza di effetti collaterali gravi (ad esempio, cardiotoxicità) rispetto ad altre sostanze psicotrope come ad esempio, gli antidepressivi triciclici (Oakes, D.K. *et al.*, 2010). Dopo il consumo, la fluoxetina viene metabolizzata a norfluoxetina che di per sé può agire come inibitore selettivo del reuptake della serotonina con lo stesso meccanismo d'azione della fluoxetina (Fuller *et al.*, 1992). Fluoxetina e norfluoxetina, vengono poi escrete dall'organismo principalmente attraverso l'urina (Altamura *et al.*, 1994; Hiemke and Härtter, 2000). Entrambi i composti entrano nei sistemi di depurazione delle acque attraverso i reflui urbani e ospedalieri ma, se non sono opportunamente eliminati con gli

specifici trattamenti, sono riversati nei sistemi idrici di acque dolci (Kolpin *et al.*, 2002) e marino-costiere (Vassog *et al.*, 2008). La fluoxetina è stata rilevata negli affluenti dei sistemi di depurazione ad una concentrazione che va da 0,4 ng/L a 18,7 ng/L (Kolpin *et al.*, 2002; Lajeunesse *et al.*, 2008) e negli effluenti dei sistemi di depurazione ad una concentrazione che va da 0,12 a 8,4 ng/L (Vasskog *et al.*, 2006; Lajeunesse *et al.*, 2008).

Tab. 1.1 Esempi di concentrazioni ng/L di fluoxetina misurati in differenti ambienti acquatici (fonte Santos *et al.*, 2010).

Fluoxetine	54910-89-3	Surface water	USA	SPE-LC-MS	18	12	[23]	Amphipod	<i>H. azteca</i>	LOEC (28 d) (growth)	100 µg L ⁻¹	[33]
Fluoxetine		Groundwater	USA	SPE-HPLC-MS	18	56	[28]			NOEC (28 d) (growth)	33 µg L ⁻¹	[33]
Fluoxetine		Drinking water	USA	SPE-LC-MS/MS	0.50	0.64	[32]	Crustacean	<i>D. magna</i>	NOEC (21 d) (newborns length)	8.9 µg L ⁻¹	[33]
Fluoxetine		STP effluent	South Korea	SPE-LC-MS/MS	1.0	1.7	[90]			LOEC (21 d) (newborns length)	31 µg L ⁻¹	[33]
Fluoxetine		Surface water	Norway	SPE-HPLC-MS	0.12	ND	[186]	Freshwater snail	<i>P. antipodarum</i>	NOEC (reproduction)	13 µg L ⁻¹	[33]
Fluoxetine		STP influent	Norway	HF-LPME-HPLC-MS	0.15	<0.12-1.3	[187]			LOEC (reproduction)	69 µg L ⁻¹	[33]
Fluoxetine		STP effluent				0.6 (±20.0)-8.4 (±22.9)						
Fluoxetine		STP influent	Canada	SPE-LC-MS/MS	0.05	3.1 (±0.3)-3.5 (±0.3)	[188]	Crustacean	<i>Gammarus pulex</i>	LOEC (behaviour)	100 ng L ⁻¹	[76]
		STP effluent				2.0 (±0.1)-3.7 (±0.1)						
		St. Lawrence River water				0.42 (±0.01)-1.3 (±0.1)		Algae	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	EC ₅₀ (96 h) (growth inhibition)	169.81 µg L ⁻¹	[70]
									<i>P. subcapitata</i>	EC ₅₀ (120 h) (growth)	24 µg L ⁻¹	[177]
										LOEC (growth)	13.6 µg L ⁻¹	[177]
								Crustacean	<i>C. dubia</i>	LC ₅₀ (48 h)	234 µg L ⁻¹	[177]
										NOEC	56 µg L ⁻¹	[177]
										LOEC	112 µg L ⁻¹	[177]

Sembra che non vi siano preoccupanti conseguenze sulla salute umana dovute al consumo di pesce o acqua potabile contaminata (Brooks *et al.*, 2005), tuttavia non sono esclusi effetti sugli animali acquatici.

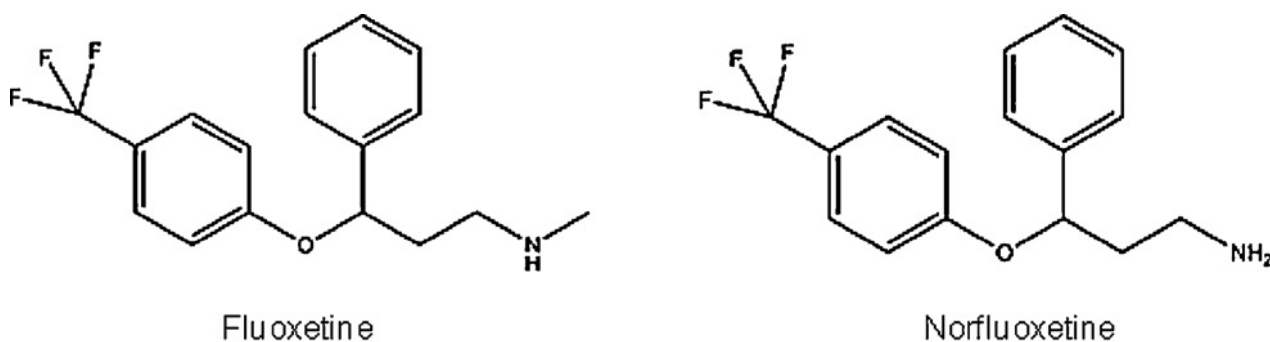


Fig. 1.18 Struttura chimica della Fluoxetina e del suo metabolita Norfluoxetina (fonte Schultz *et al.*, 2011).

La serotonina è mediatore chiave di una ampia varietà di funzioni fisiologiche nei molluschi; essa regola i processi riproduttivi tra cui la maturazione degli oociti (Fong *et al.*, 1994; Hirai *et al.*, 1988) la deposizione dei gameti (Hirai *et al.*, 1988; Ram *et al.*, 1993) e la schiusa delle uova (Fong *et al.*,

1996). La serotonina, la fluoxetina e altri inibitori selettivi del reuptake della serotonina sono utilizzati per indurre artificialmente la deposizione delle uova in acquacoltura (Cunha and Machado, 2001; Gibbons and Castagna, 1984).

1.7 PROPRANOLOLO

Il propranololo è un farmaco inibitore non selettivo dei recettori β -adrenergici, che blocca l'azione dell'adrenalina sui recettori adrenergici β_1 e β_2 del cuore, e viene utilizzato principalmente nel trattamento dell'ipertensione arteriosa, delle aritmie, e di altre patologie cardiache. Tra i recettori β -adrenergici dell'uomo e di altri vertebrati c'è elevata similarità, per cui le conseguenze per i vertebrati della fauna selvatica, come ad esempio nei pesci, sono facili da prevedere. I pesci, come altri vertebrati, possiedono questi recettori nel cuore, nel fegato e nel sistema riproduttivo pertanto l'esposizione prolungata a farmaci appartenenti a questa classe terapeutica può causare effetti deleteri (Santos *et al.*, 2010). Tuttavia, si sa poco circa la presenza di questi recettori negli invertebrati anche se le catecolamine hanno un ruolo nella metamorfosi larvale in alcuni molluschi, nel comportamento alimentare nel gasteropode *Aplysia*, e nella regolazione della bioluminescenza nelle ofiure. Nelle larve di ascidie (*Ciona savignyi*) il recettore β -adrenergico è stato localizzato ed ha il ruolo di mediare gli effetti delle catecolamine sulla metamorfosi. Tuttavia studi condotti nei crostacei hanno portato alla conclusione che in questi animali i recettori β -adrenergici sono assenti (Solé *et al.*, 2010). La maggior parte dei prodotti farmaceutici, fra cui il propranololo, è presente nell'ambiente acquatico a causa della rimozione incompleta dopo il trattamento delle acque fognarie. Il propranololo è stato rilevato negli effluenti dei sistemi di depurazione delle acque reflue ad una concentrazione che va dai 30 ng/L ai 373 ng/L (Bendz *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009; Hilton and Thomas, 2003), e nelle acque superficiali ad una concentrazione di ng/L.

Tab. 1.2 Esempi di concentrazioni ng/L di propranololo misurati in differenti ambienti acquatici (fonte Santos *et al.*, 2010).

Propranololo	525-66-6	STP influent	Sweden	SPE-LC-MS/MS	—	50	[21]	Crustacean	<i>D. magna</i>	rate) EC ₅₀ (48 h) (immobilization)	7.5 mg L ⁻¹
		STP effluent				30					
		Höje river				<1–10					
Propranololo		water	Taiwan	SPE- HPLC-MS/MS	0.5	54	[47]	Algae	<i>D. subspicatus</i>	EC ₅₀ (growth inhibition)	5.8 mg L ⁻¹
		Hospital				ND					
		Pharmaceutical									
		production									
		facility									
		effluent									
Propranololo		STP influent	United Kingdom	SPE- HPLC-MS/MS	10	60–119	[53]	Duckweed	<i>L. minor</i>	EC ₅₀ (7 d) (growth inhibition)	114 mg L ⁻¹
		STP effluent				195–373					
		Tyne river				35–107					
		water									
Propranololo		Hospital	Spain	SPE- HPLC-MS/MS	8	200–6500	[73]	Crustacean	<i>T. platyurus</i>	LC ₅₀ (24 h) (mortality)	10.31 mg L ⁻¹
		effluent									
Propranololo		Mankyung	South Korea	SPE-LC-MS/MS	10	ND–40.1 (±3)	[92]	Fish	<i>O. latipes</i>	LC ₅₀ (96 h) (mortality)	11.40 mg L ⁻¹
		river water									
Propranololo		STP effluent	United Kingdom	SPE- HPLC-MS/MS		130–180	[94]	Crustacean	<i>H. azteca</i>	LC ₅₀ (48 h) (mortality)	29.8 mg L ⁻¹
		Surface water				<10–37				NOEC (27 d) (reproduction)	0.001 mg L ⁻¹

Alcuni studi dimostrano che il propranololo è il più tossico per gli organismi acquatici, rispetto ad altri farmaci β -bloccanti, come ad esempio il metoprololo. Ad esempio negli invertebrati la DL50 del metoprololo e del propranololo ha un range di 64-100 mg/L e 0,8-29.8 mg/L rispettivamente, dimostrando che il propranololo ha effetti sugli invertebrati a concentrazioni molto inferiori rispetto al metoprololo (Cleuvers, 2003; Huggett *et al.*, 2002).

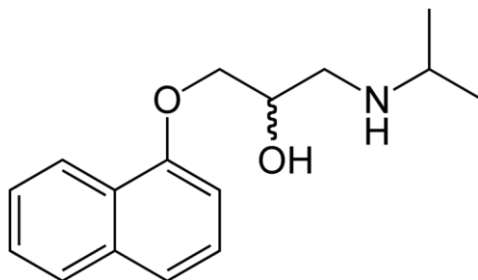


Fig. 1.19 Struttura chimica del propranololo (fonte: wikipedia.org).

1.8 BIOINDICATORI E BIOMARKERS

1.8.1 I Bioindicatori

I bioindicatori sono tutti quegli organismi che mediante reazioni identificabili (biochimiche, fisiologiche, morfologiche, ecc.) forniscono informazioni sulla qualità dell'ambiente o di una parte di esso (Bargagli *et al.*, 1998). La bioindicazione si basa sul principio ecotossicologico del "bioaccumulo" per cui un organismo animale o vegetale tende ad accumulare al suo interno concentrazioni del contaminante superiori a quelle del comparto ambientale dove si trova. Questa caratteristica si descrive con il parametro BCF (BioConcentration Factor) che indica il rapporto fra la concentrazione del contaminante nel mezzo e quella dell'organismo bioindicatore. La scelta dell'organismo bioindicatore dipende da molti fattori e soprattutto dal quesito sperimentale di partenza. Gli organismi bioindicatori e bioaccumulatori devono possedere alcune caratteristiche fondamentali quali (Casini, S., AA 2007-2008) :

- Optimum ecologico ed ampia distribuzione nell'area di studio;
- Facile identificazione sistematica;
- Adeguate conoscenze dell'anatomia, fisiologia ed ecologia della specie;
- Uniformità genetica e lungo ciclo vitale;
- Facile reperibilità stagionale.

La scelta dell'organismo bioindicatore deve tenere conto di una serie di caratteristiche relative alla sua fisiologia, al tipo di alimentazione, all'habitat ed al generale stile di vita. Tutto questo insieme di caratteristiche si identifica con la "nicchia trofica" cioè l'insieme di funzioni della specie nella comunità e le interazioni con la componente biotica ed abiotica (Bargagli *et al.*, 1998). Un altro elemento fondamentale nella scelta del bioindicatore riguarda la sua "mobilità". L'informazione che ci fornisce l'organismo bioindicatore è relativa all'area vitale dove l'organismo si muove e si alimenta. Nel caso di un organismo sedentario o sessile otterremo un'informazione puntiforme, mentre nel caso di un organismo mobile avremo un'informazione integrata dell'intera area vitale (Bargagli *et al.*, 1998; Fossi, 2000).

1.8.2 I Biomarker

Sono state date numerose definizioni per il termine biomarker, che viene generalmente usato in senso lato per quelle alterazioni che riflettono l'interazione tra un sistema biologico e un potenziale pericolo che può essere chimico, fisico, o biologico (WHO, 1993). Un biomarker è definito come quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo (individui o popolazione) la quale fornisce l'evidenza di una esposizione e/o un effetto ad uno o più composti inquinanti (Depledge, 1994). In accordo con l'NRC (1987) e con l'WHO (1993) i biomarker possono essere suddivisi in tre classi :

- Biomarker di esposizione: rivela e misura la quantità della sostanza esogena o il suo metabolita o il prodotto di un'interazione tra lo xenobiotico e alcune molecole target, che si misurano in un compartimento all'interno di un organismo;
- Biomarker di effetto: includono misure a livello biochimico, fisiologico, o altre alterazioni all'interno dei tessuti o fluidi corporei di un organismo che possono essere associati a possibili danni all'organismo;
- Biomarker di suscettibilità: indica la capacità intrinseca o acquisita di un organismo di rispondere ai cambiamenti in seguito ad esposizione di specifiche sostanze xenobiotiche, includendo fattori genetici e cambiamento dei recettori che alterano la suscettibilità di un organismo all'esposizione.

Il bioaccumulo di alcuni contaminanti ambientali persistenti nei tessuti animali, può essere considerato un biomarker di esposizione a queste sostanze chimiche (NRC, 1987; WHO, 1993). Secondo le definizioni date da Van Gestel e Van Brummelen (1996), tuttavia, il carico corporeo non viene considerato un biomarker o un bioindicatore poiché non fornisce informazioni sugli

scostamenti relativi alla salute. Per essere precisi si indica come Marker di bioaccumulo gli indici analitici/chimici (carico corporeo) mentre tutti gli indici biologici (chimici, fisiologici, istologici e morfologici) misurati all'interno dell'organismo o nei suoi prodotti, vengono indicati come Biomarker. Questi possono fornire conoscenze riguardo ai potenziali meccanismi degli effetti dei contaminanti che innescano una cascata di risposte biologiche (McCarthy *et al.*, 1991). I biomarker possono essere distinti inoltre in funzione della loro specificità di risposta rispetto ad una determinata classe di inquinanti nelle seguenti categorie:

- Alterazione del DNA;
- Risposte di proteine;
- Prodotti metabolici;
- Variazioni del sistema immunitario;
- Alterazioni istopatologiche;
- Biomarker non specifici e fisiologici;
- Biomarker comportamentali.

Il segnale che da essi si ricava è dato dalla diversa risposta temporale dell'organismo che è "precoce" (ore o giorni) nel caso di risposte molecolari e "ritardata" (settimane, mesi, anni). L'obiettivo del monitoraggio ambientale è quello di stimare, prevedere, e di conseguenza evitare eventi inaccettabili a livello ecologico, come l'insuccesso riproduttivo o l'incremento della mortalità nell'abito di una popolazione, attraverso l'utilizzo di "segnali precoci" di esposizione o di effetto. L'utilizzo di biomarkers permette in primo luogo di diagnosticare, attraverso lo studio delle risposte immediate (induzione di sistemi detossificanti, inibizione di attività enzimatiche, formazione di prodotti metabolici, alterazioni al DNA, ec.) il tipo e/o i tipi di contaminanti ai quali l'organismo bioindicatore è sottoposto ed i livelli "semi-quantitativi" dell'esposizione, e successivamente, prevedere il verificarsi degli effetti negativi a lungo termine (Peakall and Shugart, 1993; Fossi and Leonzio, 1994; Fossi, 1998; Fossi., 2000). La valutazione degli effetti dei contaminanti di origine antropica sulle comunità naturali è un problema di difficile soluzione per i seguenti motivi (Peakall and Shugart, 1993; Fossi, 1998; Fossi, 2000) :

- Esistono varie vie di assunzione dei composti inquinanti all'interno dell'organismo;
- I contaminanti presentano una diversa biodisponibilità e seconda dei comparti ambientali in cui si trovano;
- Gli organismi sono generalmente esposti non ad un solo composto inquinante ma ad una miscela di molti contaminanti (cocktail chimico); tali sostanze possono generare fra di loro diverse interazioni biochimiche e tossicologiche (sinergismi, antagonismi);

- Esiste un periodo di latenza molto lungo prima che si manifestano alterazioni a livello di popolazioni e comunità.

La conoscenza dei cicli riproduttivi della specie bioindicatrice e delle sue caratteristiche fisiologiche permettono, con un adeguato programma di campionamento, di eliminare totalmente o in parte tali fattori di disturbo. Inoltre la presenza in certi casi di un'elevata variabilità interindividuale nella risposta dei biomarkers verso uno stesso livello di esposizione, può rappresentare, se non correttamente interpretato, un fattore di disturbo nella comprensione dei dati statistici.

Lo strumento fornito dai bioindicatori permette uno studio in vivo degli effetti dei farmaci sull'ecosistema attraverso una serie di analisi ecotossicologiche che prevede l'impiego di una batteria di saggi biologici formata da specie appartenenti a gruppi sistematici, categorie trofiche, e sensibilità ai contaminanti diversi, comprendente ad esempio il batterio *Vibrio fischeri*, l'echinoderma *Paracentrotus lividus*, l'anfipode *Corophium orientale* e il crostaceo *Daphnia magna*. La tossicità acuta a breve termine, fornisce informazioni importanti esponendo gli organismi ai farmaci a concentrazioni molto alte (mg/L), che sono improbabili da trovare in ambiente. Questi risultati però potrebbero portare a concludere che non vi è alcuna minaccia potenziale per gli organismi e per l'ambiente acquatico. Per questo è necessario integrare i dati di tossicità cronica utilizzando una batteria di biomarker per dare informazioni più accurate sugli effetti dei farmaci selezionati a concentrazioni ambientali (ng-µg/L), come induzione di stress ossidativo, induzione di meccanismi di difesa, di danno al DNA ecc.. fondamentali per predire le conseguenze ecologiche causate dalla presenza di farmaci in ambiente acquatico (Schmidt *et al.*, 2011).

1.9 GLI ORGANISMI SENTINELLA UTILIZZATI

1.9.1 Struttura morfologica

Il *Mytilus galloprovincialis* fa parte della classe dei bivalvi, all'interno del phylum dei molluschi. La conchiglia dei bivalvi è composta da due valve generalmente simmetriche con lo scopo di proteggere le viscere. Sono unite da un legamento e da una cerniera e sono costituite da una matrice organica formata da proteine, mucopolisaccaridi e cristalli di carbonato di calcio, generalmente sotto forma di calcite (cristalli esagonali) o aragonite (cristalli rombici). Il legamento è fissato ai bordi delle valve e grazie alla sua elasticità, ne determina l'apertura (Goslin, 1985). E' costituito soprattutto da conchiolina, sostanza analoga alla chitina e presenta uno strato esterno e uno interno, che per la loro elasticità tendono a provocare l'apertura della conchiglia. E' separato dal mantello a livello della zona dorsale posta fra i suoi due lobi (istmo palleale) e può essere esterno alle valve oppure interno. La cerniera è un dispositivo a ingranaggio più o meno complicato nel quale i denti

di una delle valve penetrano in un cavo dell'altra. I muscoli adduttori sono inseriti perpendicolarmente rispetto alle valve e si oppongono all'azione meccanica del legamento chiudendo la conchiglia. Questi muscoli adduttori sono composti, nella maggior parte di bivalvi, da una combinazione di fibre muscolari lisce di aspetto madreperlaceo e striate d'aspetto vitreo. Il muscolo liscio madreperlaceo, essendo formato da fibre lisce, fornisce contrazioni lente e a basso consumo energetico, mentre invece i muscoli striati vitrei, formati da fibre striate, danno luogo a contrazioni rapide ed ad alto consumo energetico. Sono queste ultime che presiedono alla chiusura rapida delle valve mentre le prime provvedono alla chiusura protratta per lunghi periodi di tempo. I muscoli adduttori presentano un'attività ritmica costituita da un periodo di rilassamento, che si effettua con lentezza lasciando una fessura tra le due valve, seguita da una contrazione rapida che provoca la chiusura delle valve stesse. Questi muscoli rivestono un ruolo importante nella sopravvivenza dei molluschi, infatti dalla chiusura delle loro valve dipende la possibilità di potersi difendere dai predatori durante la permanenza in mare, ed inoltre la loro sopravvivenza nella zona intertidale, grazie alla possibilità di captare l'ossigeno atmosferico a condizione che le loro branchie restino umide. Il mantello è formato da un tessuto molle che avvolge le viscere del mollusco. Presenta un'ampia apertura inalante nella regione ventrale, attraverso cui entra l'acqua, e un orifizio esalante, vicino al muscolo adduttore posteriore da cui la espelle, dopo aver captato l'ossigeno disciolto in essa e le particelle alimentari.

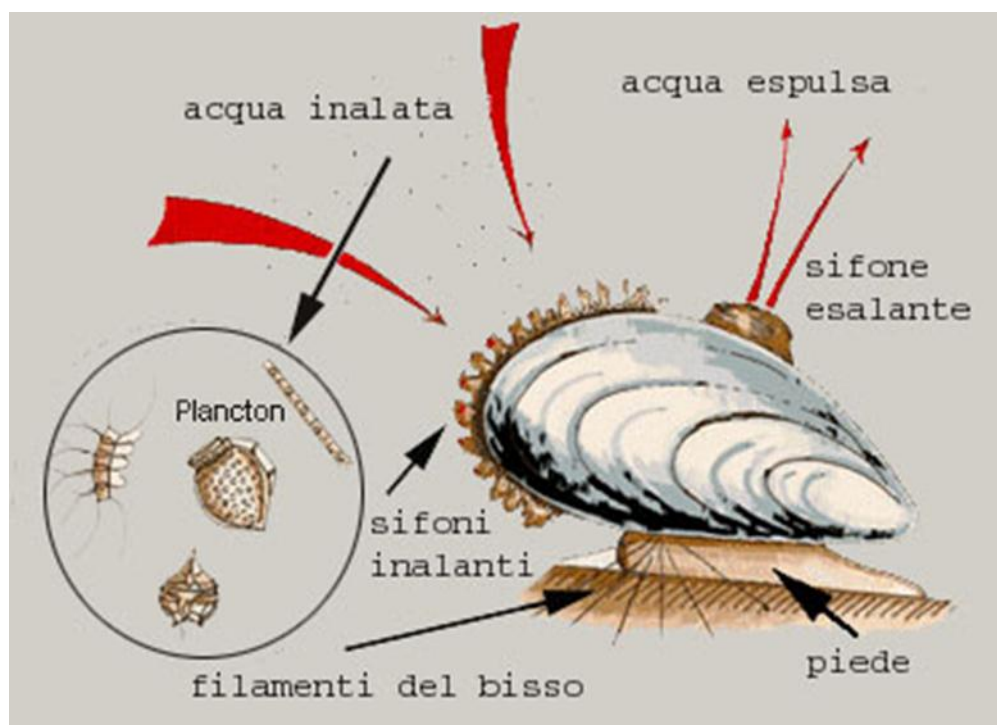


Fig. 1.20 Meccanismo di filtrazione dei Mitili (fonte : <http://www.luciopesce.net/zoologia/dispense.html>).

Il bordo del mantello presenta dei prolungamenti che, all'atto di apertura delle valve, s'intrecciano costituendo una sorta di filtro per evitare che penetrino al suo interno delle particelle di grandi dimensioni. Il mantello è generalmente attraversato da due sottili muscoli adduttori anteriori e da uno grosso posteriore, inseriti nella parte interna delle valve. La bocca, subterminale, è una fenditura trasversale le cui labbra si prolungano su entrambi i lati dell'orifizio in due paia di tentacoli labiali, lamine appiattite a forma di foglia di alloro. Sulla linea medioventrale, la massa viscerale forma una sacca più o meno resistente, dietro la quale sporge il piede da cui si apre la ghiandola bissogena, che produce dei filamenti o bisso che, partendo in fascio divergente dal suo orifizio, si fissano ad un supporto mediante la propria estremità allargata a forma di lente. Questi filamenti sono costituiti a base di aminoacidi e la loro abbondanza e resistenza dipende dallo stato fisiologico del mollusco. L'ano si apre al di sotto del muscolo adduttore posteriore, sul piano mediano (Mengoli, 1998).

1.9.2 Regolazione osmotica ed escrezione

La concentrazione ionica del sangue dei bivalvi si adatta a quella dell'esterno (salinità dell'acqua di mare), per cui le variazioni della salinità esterna fanno variare il volume del corpo del bivalve. I bivalvi presentano due reni (nefridi) a entrambi i lati del cuore, nei quali avviene la filtrazione del sangue il cui filtrato finisce nella cavità del mantello e da lì all'esterno. Espellono principalmente ammoniaca, e anche ossido di trimetilamina e urea. L'escrezione si realizza attraverso le branchie e il rene. Quando si rompe l'equilibrio osmotico in seguito a brusche e consistenti variazioni della salinità, si altera gravemente l'interscambio osmotico dei bivalvi e di conseguenza la loro fisiologia: ciò può addirittura provocare la morte in breve lasso di tempo (Mengoli, 1998).

1.9.3 Apparato digerente

L'apparato digerente dei molluschi bivalvi consta di un esofago, breve tubo che sbocca in un ampio stomaco, a pareti pieghettate, crivellato di fori che sono gli orifizi dei diverticoli digerenti. Questi si presentano notevolmente ramificati e terminano in sacche cieche formati da acini ghiandolari. L'insieme costituisce la ghiandola digerente. I tubuli digerenti sono composti da cellule cigliate (come lo stomaco e l'esofago) e da cellule vacuolari ricche di pigmenti carotenoidi, glucoproteidi e lipidi. Lo stomaco si presenta come un lungo diverticolo cieco che contiene lo stilo del cristallino, sottile fusto trasparente che va a poggiarsi su uno scudo gastrico. Tale stilo è costituito da strati concentrici di mucoproteidi secreti continuativamente dalle pareti ghiandolari del fondo della sacca. La sua estremità anteriore sporge nello stomaco e urta contro uno strato cuticolare dentellato della parete dello stomaco, gira su se stesso (da 10 a 80 volte al minuto) liberando enzimi. L'intestino è

relativamente lungo, più o meno ripiegato su se stesso, si apre al di sotto del muscolo adduttore posteriore ed è anch'esso ciliato. Nel suo percorso attraversa il ventricolo cardiaco prolungandosi fino al retto per sboccare nell'ano (Mengoli, 1998).

1.9.4 Alimentazione e digestione

L'alimentazione dei molluschi bivalvi è microfaga, ossia a base di fitoplancton (microalghe) nonché di particelle organiche mantenute in sospensione nell'acqua. In condizioni normali, un mitilo di media dimensione, filtra all'incirca da 4 a 5 litri d'acqua all'ora, ed è in grado di trattenere il 90% delle particelle contenute in essa, sempre che rientrino nella gamma delle dimensioni filtrabili. Sono le ciglia laterali delle branchie che con il loro battito creano la corrente alimentare inalante. Questa corrente formata dalle ciglia laterali è più che sufficiente ad assicurare la respirazione dell'individuo. Con le valve leggermente socchiuse, si produce una lieve corrente inalante che fornisce nuova acqua alla zona ventrale della cavità palleale. Questa corrente penetra nell'emibranchia passando tra i filamenti adiacenti; le ciglia latero-frontali, fanno da setaccio trattenendo le particelle trasportate da detta corrente. Le particelle trattenute dalle ciglia latero-frontali vengono "consegnate" alle ciglia frontali del filamento branchiale che provvedono a mescolarle nel muco secreto dalle cellule ghiandolari e a trasportarle verso i solchi alimentari. Questi solchi sono depressioni cigliate che corrono su tutta la lunghezza delle lamine branchiali e sono situati sul bordo ventrale e dorsale delle medesime e convogliate verso i palpi labiali e alla bocca. Le particelle vengono selezionate in base alla dimensione, rugosità, gusto ecc. ; quelle accettate vengono trasportate verso la bocca mentre quelle respinte vengono portate al bordo ventrale dei tentacoli e di lì al mantello per la loro espulsione. Le particelle alimentari agglutinate all'interno di un cordone mucoso, penetrano nella bocca e vengono convogliate attraverso un breve esofago cigliato che sbocca nello stomaco. Questo organo è circondato da una grande massa ghiandolare a funzioni primordialmente digerenti: la ghiandola digerente o epatopancreas. Lo stomaco ha due regioni chiaramente differenziate: quella dorsale nella quale sboccano l'esofago e i condotti della ghiandola digerente; e la regione ventrale, a forma di sacca, nella quale si trova lo stilo cristallino, anch'essa ghiandolare, secernente una serie di enzimi, quali amilasi, cellulasi e lipasi. Questi enzimi vengono assorbiti dalla matrice proteica mano a mano che questa si forma sul fondo della sacca. Le pareti del tratto superiore della sacca sono rivestite di ciglia che imprimono allo stilo, come già precedentemente visto, un movimento rotatorio. Cosicché quest'ultimo, che ha un'estremità poggiante sullo scudo gastrico, si consuma per sfregamento, liberando nello stomaco gli enzimi che contiene. La velocità di rotazione dello stilo è condizionata dalla temperatura, dal pH e dalla pressione del cibo presente nello stomaco. Il cordone mucoso che penetra attraverso

l'esofago è diretto verso lo stilo, facilitando sia la penetrazione del cordone alimentare nello stomaco, sia durante il disfacimento del cordone stesso, il mescolarsi delle particelle alimentari con gli enzimi e la loro distribuzione sulle pareti dello stomaco. L'intestino, anch'esso cigliato, è relativamente lungo e forma varie anse nella zona stomacale della ghiandola, prolungandosi posteriormente verso il retto, il quale attraversa il pericardio e il ventricolo per sboccare nell'ano da dove le feci vengono espulse all'esterno (Mengoli, 1998).

1.9.5 Apparato respiratorio

La respirazione viene effettuata attraverso le branchie, che sono responsabili dell'interscambio gassoso, oltre ad essere il luogo in cui si realizza la captazione delle particelle alimentari che penetrano nella cavità palleale. Esse sono situate a sinistra e a destra del corpo e tra la massa viscerale e il mantello. Le branchie sono formate da filamenti più o meno lunghi che si diramano da un asse longitudinale. L'insieme di filamenti di una medesima linea forma una lamina branchiale. I filamenti si ripiegano su se stessi, tutti al medesimo livello, ad una certa distanza dal loro punto di intersezione, formando una lamina diretta e una lamina riflessa. I filamenti di una stessa lamina sono tenuti uniti da ciuffi di ciglia vibratili, che s'intersecano le une nelle altre come le setole sovrapposte di due spazzole. I filamenti branchiali sono rivestiti da un epitelio abbondantemente cigliato sulla faccia esterna. Ciò è necessario per mantenere la corretta circolazione dell'acqua attraverso la branchia, nonché della corrente esalante che elimina le tossine metaboliche e le particelle di scarto della cavità palleale. Attraverso le branchie, i molluschi bivalvi sono in grado di captare, oltre all'ossigeno disciolto nell'acqua, anche altre sostanze disciolte quali macromolecole e ioni, in quanto essi agiscono come un filtro nel quale vengono trattenute le particelle alimentari attaccate al muco che la superficie delle branchie possiede (Mengoli, 1998).

1.9.6 Apparato riproduttore

Nel *M. galloprovincialis* i sessi sono separati e la fecondazione si realizza a caso e avviene in mare. Le femmine producono nelle ovaie una sostanza che, spargendosi nell'acqua di mare, provoca l'eiaculazione nei maschi vicini e, a sua volta, lo sperma eiaculato nell'acqua scatena nelle femmine la deposizione delle uova. Non vi è quindi copulazione e la fecondazione è esterna, oppure avviene nella cavità del mantello della madre (Mengoli, 1998).

1.9.7 Apparato circolatorio

L'apparato circolatorio è costituito da un cuore dorsale racchiuso in un pericardio che comprende un ventricolo e due atri laterali. La circolazione dei mitili è aperta, ossia il sangue strava e inonda i tessuti formando un sistema lagunare in parte del suo percorso. I molluschi sono animali a sangue

freddo e quindi la loro temperatura corporea si adatta a quella dell'ambiente. Pertanto se la temperatura ambientale aumenta rapidamente, possono essere colpiti da embolia gassosa (Mengoli, 1998).



Fig. 1.21 Anatomia del *Mytilus Galloprovincialis* (fonte Wikipedia.org).

I molluschi bivalvi sono organismi sessili che vivono nell'interfaccia acqua/sedimento filtrando grandi volumi d'acqua includendo materiale sospeso e colloidali. Questi animali vivono in ambienti caratterizzati da un ampio range di salinità e temperatura e sono estremamente tolleranti verso i cambiamenti dei parametri biotici e abiotici, rappresentando quindi un modello adatto allo studio delle alterazioni fisiologiche imposte agli ambienti di transizione. A causa delle consistenti risposte sviluppate in seguito all'esposizione ad agenti inquinanti, i mitili sono stati ampiamente utilizzati come organismi sentinella nel programma di biomonitoraggio ambientale a livello internazionale (Viarengo *et al.*, 2007).

CAP. 2

SCOPO DELLA TESI

La presenza di farmaci in ambiente marino costiero è un recente argomento di studio (Santos *et al.*, 2010) e la scoperta degli effetti sugli organismi acquatici ha sollevato preoccupazioni per il loro stato di salute, per i rischi ambientali, e per gli eventuali effetti che queste sostanze possono avere sull'uomo (Franzellitti *et al.*, 2011). I farmaci e i loro metaboliti, vengono escreti dall'uomo raggiungendo, attraverso le acque reflue, i sistemi di depurazione. Tuttavia la ridotta percentuale di rimozione determina che i farmaci stessi raggiungano i corpi idrici. Anche se nelle acque superficiali sono presenti in tracce (ng-µg/L), alcuni farmaci causano effetti avversi a concentrazioni ancora più basse (es. ≤ 1 ng/L). A causa della natura conservatrice dei processi fisiologici, molte specie acquatiche possiedono molecole target simili a quelle dell'uomo, con i quali i farmaci interagiscono per indurre gli effetti terapeutici. Di conseguenza le interazioni farmacologiche in specie non bersaglio (ad esempio i mitili) possono provocare effetti potenzialmente negativi (Fick *et al.*, 2010). Inoltre, nell'uomo i farmaci hanno in genere effetti collaterali ad alte dosi o per tempi di trattamento prolungati. Nelle specie non bersaglio questi effetti possono generarsi a basse concentrazioni, provocando alterazioni dello stato di salute. I molluschi bivalvi sono organismi sessili che vivono nell'interfaccia sedimento/acqua filtrando grandi volumi di acqua includendo materiale sospeso e colloidali. Essi sono molto studiati per le risposte fisiologiche manifestate dopo esposizione ad un'ampia serie di contaminanti, e vengono considerati ottime sentinelle ambientali. Alcuni studi hanno evidenziato la loro sensibilità a residui di farmaci ambientali (Franzellitti *et al.*, 2010). Poiché i farmaci non sono presenti in ambiente da soli, ma in miscele, questa tesi si propone di studiare i potenziali effetti della fluoxetina (farmaco antidepressivo), propranololo (farmaco β -bloccante) o della miscela dei due farmaci, sul *Mytilus galloprovincialis* dopo una settimana di esposizione ad una concentrazione di 0,3 ng/L, scelta perché nell'intervallo delle concentrazioni riscontrate in ambiente. Le indagini sono state condotte utilizzando una batteria di biomarker che consente di valutare effetti di diverso tipo:

- sullo stato di salute generale degli organismi, valutato mediante un biomarker di citotossicità ossia la stabilità delle membrane lisosomiali con il metodo del Neutral Red Retention;
- sull'azione di enzimi coinvolti nel metabolismo delle sostanze xenobiotiche, come l'etossiresorufina-O-dietilasi e la dibenzilfluoresceina
- sul compartimento di difesa allo stress ossidativo, tramite il saggio dell'attività della catalasi e della glutatione S-transferasi;
- sugli prodotti intermedi e finali della perossidazione lipidica, come malondialdeide, lipofuscine, lipidi neutri e rapporto citoplasma/Lisosomi;
- sull'integrità della molecola di DNA.

CAP. 3

MATERIALI E
METODI

3.1 ESPOSIZIONE DEI MITILI AL TRATTAMENTO CON FLUOXETINA E PROPANOLOLO

Al fine del presente studio, i mitili sono stati esposti per sette giorni in acquario a fluoxetina o propranololo ad una concentrazione di 0,3 ng/L e alla miscela dei due farmaci. Questa concentrazione è stata scelta sulla base dei risultati ottenuti da precedenti esperimenti, nel quale si sono osservate delle risposte fisiologiche da parte dei mitili a cinque concentrazioni di fluoxetina e di propranololo (Franzellitti *et al.*, 2011), attivi già a concentrazioni basse simili a quelle riscontrate in ambiente. La concentrazione finale è stata ottenuta effettuando diluizioni, partendo da una soluzione stock sia di fluoxetina che propranololo, per poi arrivare ad una concentrazione di 0,1 μ M.

Per ogni trattamento sono state utilizzate tre vasche e in ogni vasca sono stati collocati 15 mitili, provenienti da un allevamento di Cesenatico, e posti in 7,5 litri di acqua di mare. Ogni giorno sono stati somministrati i farmaci nelle rispettive vasche e il cibo per gli animali (187,5 μ L), mentre l'acqua è stata cambiata ogni 48 ore. Sono state previste anche tre vasche di controllo in cui i mitili non sono stati esposti ai farmaci.

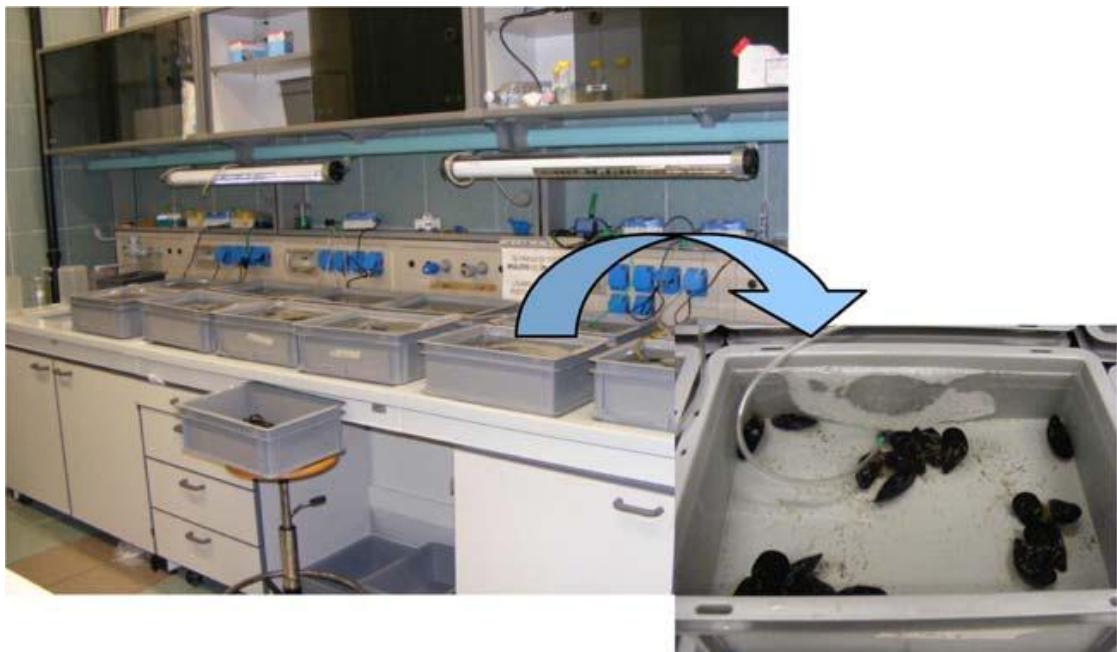


Fig. 3.1 Vaschette contenenti i mitili esposti ai farmaci.

Prima di iniziare l'esperimento e conclusi i sette giorni di esposizione ai farmaci, è stata prelevata l'emolinfa dei mitili per il test del Neutral Red (vedi poi) e si è proceduto alla dissezione degli animali con il prelievo di branchie, mantello e ghiandola digestiva che sono stati poi conservati a -

80° C. Per la valutazione delle lipofuscine, dei lipidi neutri e della stabilità delle membrane lisosomiali e del rapporto lisosomi/citoplasma, sono state prelevate le ghiandole di 4 mitili per vasca, trasferite sui rispettivi supporti di alluminio per il criostato (chucks), congelate istantaneamente utilizzando l'N-esano raffreddato in azoto liquido e poi conservate a -80°C.

3.2 NEUTRAL RED RETENTION ASSAY (NRRA)

Questo metodo si basa sul principio che il colorante (neutral red) somministrato agli emociti vitali viene immagazzinato all'interno dei compartimenti lisosomiali quando le cellule sono in buono stato di salute; qui può essere trattenuto anche fino a 180 minuti. Se le membrane lisosomiali sono destabilizzate, fenomeno che avviene quando i mitili sono stati esposti ad agenti di stress, il neutral red viene perso all'interno del citosol (Lowe and Pipe, 1994). Gli emociti sono prelevati dal muscolo adduttore dei mitili mediante una siringa ipodermica da 2.5 mL contenente, al momento del prelievo, una piccola quantità di soluzione fisiologica. Per la preparazione dei vetrini si procede con l'aggiunta di 5 µL di poli-L-lisina, per far aderire gli emociti, e aggiungendo 40 µL di emolinfa ponendoli al centro del vetrino, il tutto si lascia al buio per 30 minuti in una camera umida in modo da far aderire gli emociti sulla superficie del vetrino. Dopo aver eliminato il liquido in eccesso inclinando il vetrino, si aggiungono 40 µL di neutral red e si lascia in incubazione per 15 minuti al buio all'interno di una camera umida. Si inclina di nuovo il vetrino per eliminare il liquido in eccesso e si aggiunge il vetrino coprioggetto. I vetrini vengono osservati al microscopio ottico (Zeiss, Axioscop 40) ogni 15 minuti fino a quando più del 50% delle cellule mostra una perdita di colorante dovuto alla destabilizzazione delle membrane lisosomiali o anomalie come un ingrandimento cellulare (Moore *et al.* 2008). Questo dato viene registrato e permetterà il calcolo della % di lisosomi destabilizzati nei controlli e negli animali esposti.

3.3 ACCUMULO DEI LIPIDI NEUTRI

La valutazione dei lipidi neutri nei lisosomi si basa sulla loro colorazione selettiva ad opera di uno specifico colorante, Oil Red (Donnini *et al.* 2007) e successiva analisi al microscopio.

3.3.1 Preparazione dei vetrini

I chucks vengono posizionati all'interno del criostato (Microm, HM505 N) ottenendo fettine di 10 µm di spessore che poi vengono fatte aderire al vetrino. Si fissa il tutto in una soluzione di Ca-formolo per 15 minuti a 4°C. Si lava con acqua distillata e i vetrini si pongono in Trietilfosfato 60% per 3 minuti a temperatura ambiente. In seguito, le sezioni si colorano con una soluzione di Oil Red all'1% per 15 minuti al buio a temperatura ambiente e in seguito si fissa il colorante in Trietilfosfato

60% per 30 secondi a temperatura ambiente. I vetrini vengono risciacquati in acqua distillata e fissati in gel di glicerina.

3.3.2 Analisi d'immagine dei vetrini

Le fettine di ghiandola digestiva sono analizzate mediante un sistema di analisi d'immagine al microscopio ottico (Zeiss, Axioskop 40) per la determinazione della colorazione assunta dai lipidi neutri accumulati all'interno dei lisosomi. Tramite l'analisi d'immagine eseguita con il software ScionImage 4.0.3.2., si determina la superficie colorata di ogni sezione di ghiandola, proporzionale alla quantità di lipidi neutri presenti.



Fig. 3.2 Microscopio elettronico Zeiss, Axioskop 40.

3.4 ACCUMULO DELLE LIPOFUSCINE

Questo metodo si basa sulla colorazione selettiva delle lipofuscine all'interno dei lisosomi utilizzando il reattivo di Schmorl (Pearse, 1972) e successiva analisi al microscopio.

3.4.1 Preparazione dei vetrini

I chucks vengono posizionati all'interno del criostato (Microm, HM505 N) ottenendo fettine di 10 μm di spessore che poi vengono fatte aderire al vetrino. Si fissa il tutto in una soluzione di Caformolo per 15 minuti a 4°C. Si immergono in una soluzione 3:1 di Cloruro di Ferro FeCl_3 1% e Potassio Ferrocianuro $\text{Fe}(\text{KCN})_6$ 1% a temperatura ambiente per 5 minuti, al buio. Per fissare il colorante si aggiunge acido acetico CH_3COOH 1% per 1 minuto. Si risciacquano i vetrini con acqua distillata, si mettono ad asciugare e vengono fissati con gel di glicerina.

3.4.2 Analisi d'immagine dei vetrini

Le fettine di ghiandola digestiva sono state analizzate mediante un sistema di analisi d'immagine al microscopio ottico (Zeiss, Axioskop 40) per la determinazione della colorazione assunta dai lisosomi dovuta all'accumulo di lipofuscine. Tramite l'analisi d'immagine eseguita con il software ScionImage 4.0.3.2., si determina la superficie colorata di ogni sezione di ghiandola, proporzionale alla quantità di lipofuscine presenti.

3.5 RAPPORTO LISOSOMI/CITOPLASMA

3.5.1 Preparazione dei vetrini

I chucks vengono posizionati all'interno del criostato (Microm, HM505 N) ottenendo fettine di 10 µm di spessore che poi vengono fatte aderire al vetrino. Quest'ultimi vengono messi in vaschette di Hellendal contenenti una soluzione di Polypep e Naftolo a 37° in agitazione per 20 minuti. Si lavano i vetrini con NaCl 3% a temperatura ambiente. Si versa la soluzione di Violet nell'Hellendal e si lascia al buio per 10 minuti a temperatura ambiente. Si sciacquano i vetrini per 5 minuti sotto l'acqua corrente, si mettono ad asciugare e si fissano con gel di glicerina.

3.5.2 Analisi d'immagine dei vetrini

Le fettine di ghiandola digestiva sono state analizzate mediante un sistema di analisi d'immagine al microscopio ottico (Zeiss, Axioskop 40) per la determinazione della colorazione assunta dai lisosomi dovuta all'attività dell'enzima N-Acetyl-b-esosaminidasi. Tramite l'analisi d'immagine eseguita con il software ScionImage 4.0.3.2., si determina la superficie colorata di ogni sezione di ghiandola corrispondente al volume dei lisosomi, rispetto alla sezione non colorata delle cellule, corrispondente al citoplasma cellulare.

3.6 SAGGI ENZIMATICI

3.6.1 Preparazione dei campioni per l'analisi dell'attività di EROD e DBF e per la valutazione del danno al DNA

Per la valutazione dell'attività di EROD, DBF e di un eventuale danno al DNA, sono state utilizzate le ghiandole di 3 mitili per vasca per ogni trattamento; dopo aver aggiunto 3 volumi di tampone di omogeneizzazione, i campioni sono stati omogeneizzati con un ultraturrax ad una velocità di 24.000 rpm per 30 secondi. Parte del campione ottenuto è stato congelato a -80°C per la valutazione del danno al DNA e la rispettiva determinazione della concentrazione delle proteine totali, mentre per l'EROD e DBF il campione è stato centrifugato a 15.000g (13.123 rpm) per 20 minuti a 4°C; una parte di sovrantante è stata prelevata per la determinazione delle proteine totali, e il restante aliquotato in eppendorf e congelato a -80°C per la determinazione dell'attività di EROD e DBF.



Fig. 3.3 Omogenizzatore ultraturax.

3.6.2 Determinazione dell'attività dell'etossiresorufina-o-deetilasi (EROD)

L'attività dell'EROD è stata determinata usando il protocollo descritto da Quinn *et al.* (2004). I campioni (200 μL) sono stati posti in duplicato in provette alle quali sono stati aggiunti 300 μL di buffer di omogeneizzazione e 1600 μL di substrato 7-etossiresorufina (50 μM). La determinazione della 7-etossiresorufina nei campioni è stata condotta usando una curva di calibrazione di standard di resorufina (5 μM) a concentrazioni 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1 (nmoli). La reazione è stata fatta partire con l'aggiunta di 100 μL di NADPH 1 mM. La quantità di resorufina prodotta è stata determinata al tempo 0, 15 e 30 minuti mediante uno spettrofluorimetro (Jasco FP-6200) ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 516 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 600 nm. I risultati sono espressi in pmoli/min*mg proteine.

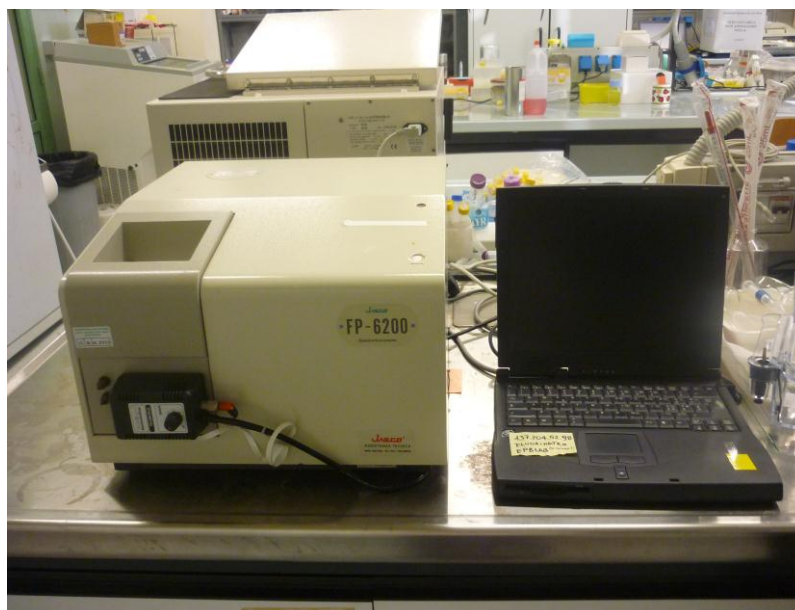


Fig. 3.4 Fluorimetro Jasco FP-6200.

3.6.3 Determinazione dell'attività della dibenzilfluoresceina dealchilasi (DBF)

L'attività della dibenzilfluoresceina dealchilasi è stata determinata usando il protocollo descritto da Quinn *et al.* (2004). I campioni (500 μL) sono stati messi in duplicato in provette nelle quali sono stati aggiunti 1600 μL di substrato, dibenzilfluoresceina (10 μM). La determinazione della attività nei campioni, misurando il prodotto di reazione, è stata portata avanti usando una curva di calibrazione di standard di fluoresceina (5 μM) a concentrazioni 0; 0,05; 0,1; 0,15; 0,25 nmoli. La reazione è stata fatta partire con l'aggiunta di 100 μL di NADPH 1 mM. La quantità di fluoresceina prodotta è stata determinata al tempo 0, 10, 20 e 30 minuti mediante uno spettrofluorimetro (Jasco FP-6200) ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm e di emissione di 516 nm. I risultati sono espressi in pmol/min*mg proteine.

3.6.4 Determinazione del danno al DNA

Il danno al DNA è stato determinato seguendo il protocollo di Olive (1988) basato sulla precipitazione delle proteine legate all'SDS, lasciando il DNA danneggiato nel sovrantante. Ai campioni (100 μL) in duplicato è stato aggiunto SDS 2% e KCl 0,12M e sono stati posti a 60°C per 10 minuti e a 4°C per 30 minuti. Successivamente sono stati centrifugati a 8000 g per 5 minuti e il sovrantante prelevato è stato posto in cuvette di quarzo. La determinazione del danno al DNA è stata effettuata usando una curva di calibrazione di standard di sperma di salmone a concentrazioni 0; 0,455; 0,91; 2,27; 4,55; 11,36 ($\mu\text{g}/\text{mL}$). La reazione è stata fatta partire con l'aggiunta di Hoechst (substrato), e la fluorescenza è stata misurata con il fluorimetro (Jasco FP-6200) ad una banda di

eccitazione di 360 nm e una banda di emissione di 450 nm. I risultati sono espressi in $\mu\text{g}/\text{mg}$ di proteine.

3.6.5 Preparazione dei campioni per l'analisi dell'attività di Catalasi e GST

La preparazione dei campioni è stata eseguita utilizzando il protocollo di Mimeault *et al.*, 2006. I campioni sono stati ottenuti omogeneizzando le ghiandole di 2 mitili per vasca (quindi 6 per trattamento) in 5 volumi di tampone di omogeneizzazione KPB 50 mM e aggiungendo 1 μL di cocktail di inibitori delle proteasi ogni 100 mg totali di tessuto. L'omogenato è stato condotto con un potter e centrifugato a 15.000 g (13.000 rpm) a 4°C per 15 minuti. Il sovrantante è stato in parte prelevato per la determinazione delle proteine totali e in parte congelato in eppendorf a -80° C per la determinazione delle attività degli enzimi.



Fig. 3.5 Potter di omogenizzazione.

3.6.6 Determinazione dell'attività della Catalasi

L'attività della Catalasi è stata determinata usando il protocollo di Mimeault *et al.*, 2006. Il campione (30 μL) è stato posto in una cuvetta di quarzo nel quale sono stati aggiunti H_2O_2 (55 mM) e tampone di omogeneizzazione KPB (50 mM) precedentemente preparato, per un volume finale di 3 mL nella cuvetta. L'attività dell'enzima è stata determinata attraverso uno spettrofotometro (Beckman Coulter, DU 800 Spectrophotometer) valutando la diminuzione dell'assorbanza a 240 nm dovuta al consumo del perossido d'idrogeno. La reazione è stata seguita

per due minuti e l'attività finale è stata espressa in $\mu\text{mol}/\text{min} * \text{mg}$ proteine (Martin-Diaz *et al.*, 2009).



Fig. 3.6 Spettrofotometro Beckman Coulter, DU 800 Spectrophotometer.

3.6.7 Determinazione dell'attività della glutazione s-transferasi (GST)

Il campione è stato diluito 1:1 con il tampone di omogeneizzazione KPB (50 mM) ed è stato caricato su una piastra nel quale sono stati aggiunti precedentemente 1-Cl-2,4-dinitrobenzene CDNB (0,8 M) e il glutatione. L'attività della GST è stata determinata misurando l'incremento dell'assorbanza a 340 nm dovuto alla coniugazione del CDNB con il glutatione ridotto (GSH) (Martin-Diaz *et al.*, 2009) il tutto mediante un lettore di micropiastre (Biotek EL 808).



Fig. 3.7 Lettore di micropiastre Biotek EL 808.

3.7 DETERMINAZIONE DELLA MALONDIALDEIDE (MDA)

La malondialdeide è stata determinata seguendo il protocollo di Banni *et al.* (2007). Sono state utilizzate le ghiandole di due mitili per vasca (quindi 6 per trattamento) e sono stati aggiunti due volumi di tampone TRIS-HCl (20mM) contenente 0,1% di β -mercaptoetanololo. Il tutto è stato omogenato tramite un potter, e centrifugato a 10400 rpm (10000 g) a 4 ° C per 20 minuti. Il sovrinatante è stato in parte prelevato per il dosaggio delle proteine, e in parte aliquotato e congelato a -80°C. Ai campioni è stato aggiunto NMPI (N-methyl-2-phenylindole) sciolto in acetonitrile e metanolo, HCl 37% 10,1 N e sono stati posti a bagnomaria per 40 minuti a 45°C in agitazione. Successivamente sono stati centrifugati a 13200 rpm (15000 g) per 10 minuti a temperatura ambiente. Il sovrinatante è stato prelevato e caricato nella micropiastra. L'assorbanza è stata letta a 570 nm con un lettore di micropiastre (Biotek EL 808); la concentrazione di MDA nei campioni è stata valutata usando una curva di calibrazione di standard di TMOP (1,1,3,3,tetrametossipropano). Il risultato finale è stato espresso in nmol/mg proteine (Martin-Diaz *et al.*, 2009).

3.8 DOSAGGIO DELLE PROTEINE

La concentrazione delle proteine totali presenti nei campioni è stata valutata mediante il protocollo di Lowry *et al.*, 1951. Il campione, già diluito 1:5 in NaOH (1 N), viene ulteriormente diluito 1:1 con acqua distillata. La quantità di proteine nei campioni è stata determinata usando una curva di calibrazione di standard di BSA (albumina). I campioni e gli standard sono stati caricati nei pozzetti di una micropiastra alla quale sono stati aggiunti successivamente il reattivo A+B (Na^+K^+ tartrato 0,7 mM; Na_2CO_3 187 mM ; NaOH 100 mM) e poi il reattivo C (soluzione 1:1 del Reattivo di Folin con acqua distillata) per poi essere letti nel lettore di micropiastre (Biotek EL 808). I risultati sono espressi in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ di campione.

3.9 ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati usando il pacchetto software statistico SigmaStat. Sono state determinate differenze significative tra i campioni trattati e i controlli usando l'ANOVA a una via seguita da un confronto multiplo utilizzando il test di Tukey. Le differenze tra i dati sono state ritenute significative per valori di $p < 0,05$ e altamente significative per $p < 0,01$.

Il test di correlazione tra i biomarker è stata effettuato usando il software statistico SPSS/PC. Le correlazioni significative sono state esaminate usando il test di Spearman con livelli di significatività per valori di $p < 0,05$.

CAP.4

RISULTATI

4.1 NEUTRAL RED RETENTION ASSAY

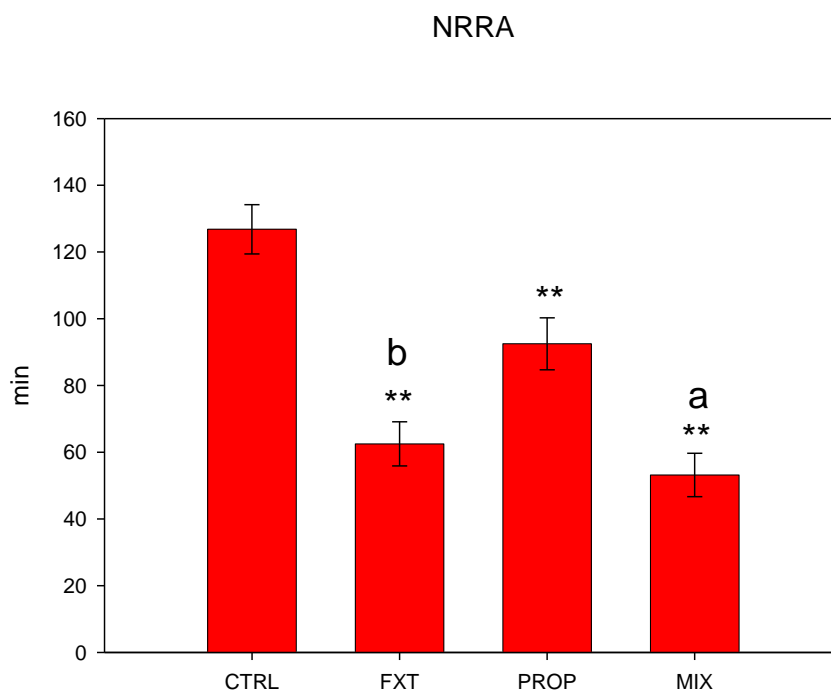


Fig. 4.1 Stabilità delle membrane lisosomiali in molluschi esposti a fluoxetina, propranololo e alla miscela dei due farmaci. **: $p < 0,01$ rispetto al controllo; a: $p < 0,01$ propranololo rispetto alla mix ; b: $p < 0,05$ propranololo rispetto alla fluoxetina. I risultati sono espressi in minuti.

L'effetto della fluoxetina, propranololo e la miscela dei due farmaci sulla stabilità delle membrane lisosomiali degli emociti dei molluschi, è illustrata nella fig. 4.1. Il tempo di stabilizzazione della membrana lisosomiale è di circa 126 minuti negli emociti degli animali di controllo, c'è una riduzione altamente significativa nei mitili esposti ai farmaci con un tempo di destabilizzazione della membrana lisosomiale di 62 minuti nei mitili esposti a fluoxetina, 92 minuti nei mitili esposti a propranololo e di 53 minuti nei mitili esposti alla miscela dei due farmaci dopo 7 giorni di esposizione a 0,3 ng/L rispettivamente. L'ANOVA ha riscontrato una differenza altamente significativa ($p < 0.01$) nei lisosomi dei mitili esposti al propranololo rispetto ai lisosomi dei mitili esposti alla miscela dei due farmaci ed una differenza significativa ($p < 0,05$) nei lisosomi dei mitili esposti al propranololo rispetto ai lisosomi dei mitili esposti al fluoxetina.

4.2 RAPPORTO LISOSOMA/CITOPLASMA

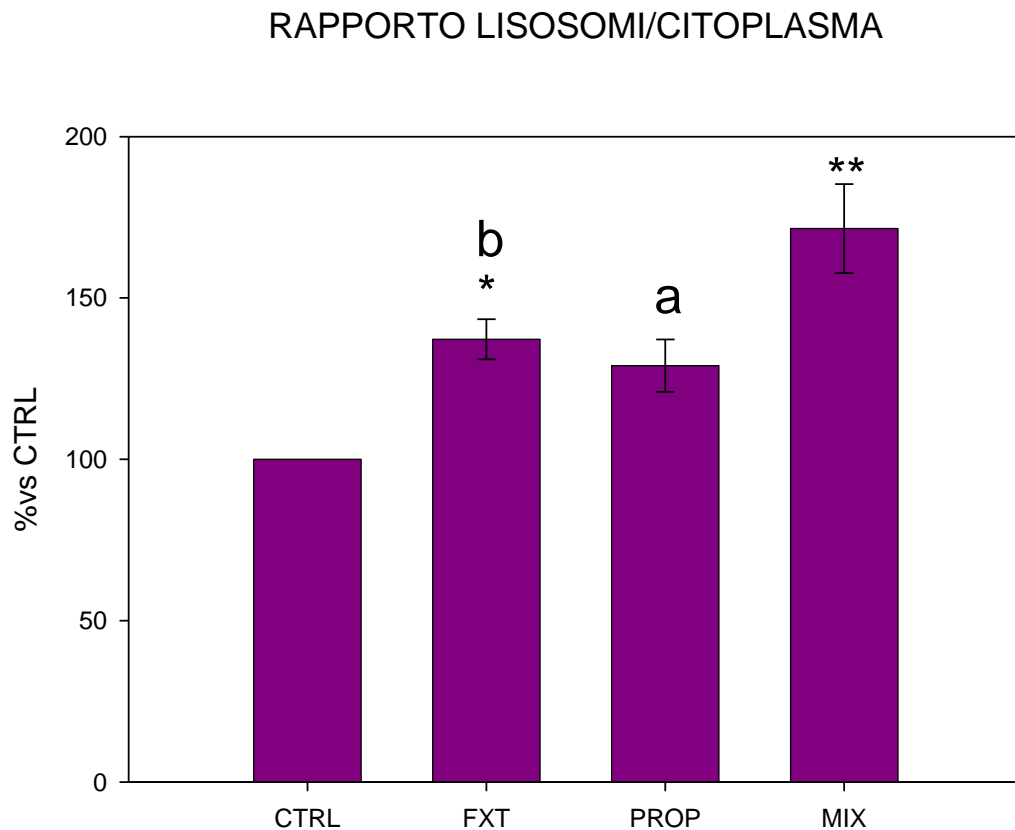


Fig. 4.2 Rapporto lisosoma/citoplasma in molluschi esposti a fluoxetina, propranololo e alla miscela dei due farmaci.
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; a: $p < 0,01$ propranololo rispetto alla mix ; b: $p < 0,05$ fluoxetina rispetto alla mix. I risultati sono espressi in % rispetto al controllo.

La percentuale del rapporto lisosomi/citoplasma nei mitili esposti per 7 giorni a fluoxetina (0,3 ng/L) propranololo (0,3 ng/L) e alla miscela dei due farmaci (fig. 4.2) mostra un aumento nei lisosomi dei mitili esposti alla fluoxetina, propranololo e miscela dei due farmaci rispetto al controllo. Questo aumento è significativo per quanto riguarda la fluoxetina e la miscela, si osservano inoltre differenze statisticamente significative tra fluoxetina e mix ($p < 0,05$) e tra propranololo e mix ($p < 0,01$).

4.3 ACCUMULO DEI LIPIDI NEUTRI

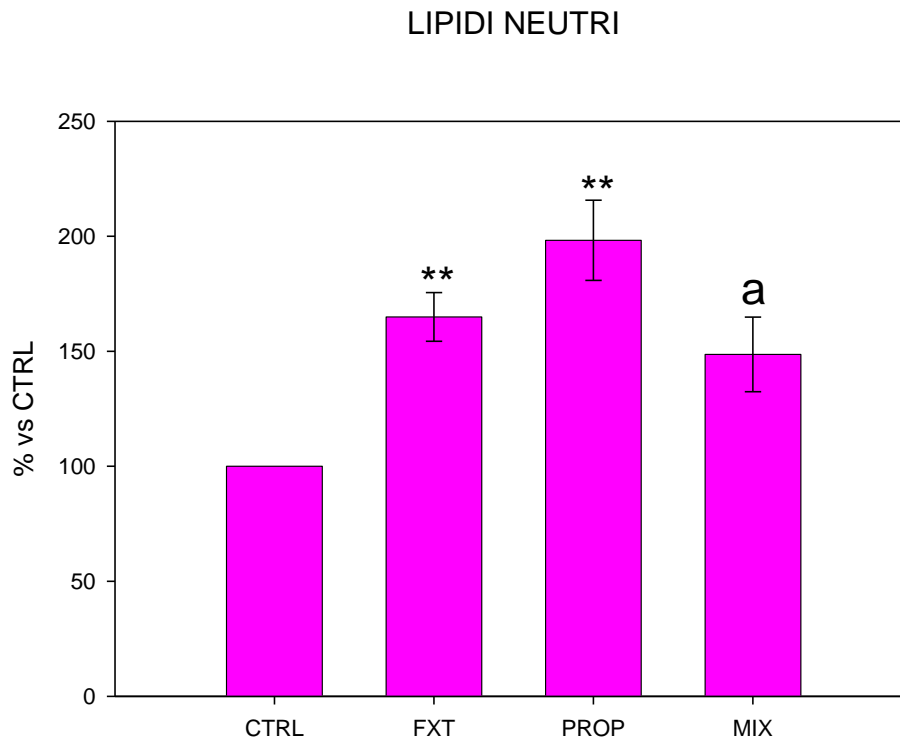


Fig. 4.3 Accumulo dei lipidi neutri in molluschi esposti a fluoxetina, propranololo e alla miscela dei due farmaci. ** $p < 0,01$; a: $p < 0,05$ propranololo rispetto alla mix. I risultati sono espressi in % rispetto al controllo.

La percentuale dei lipidi neutri nei mitili esposti per 7 giorni a fluoxetina (0,3 ng/L) propranololo (0,3 ng/L) e alla miscela dei due farmaci (fig. 4.3) mostra un aumento altamente significativo nei lisosomi dei mitili esposti a fluoxetina e propranololo rispetto al controllo, ma non rileva differenze nei lisosomi dei mitili esposti alla mix rispetto al controllo. Si osserva invece una differenza significativa ($p < 0,05$) tra il propranololo rispetto alla mix.

4.4 ACCUMULO DELLE LIPOFUSCINE

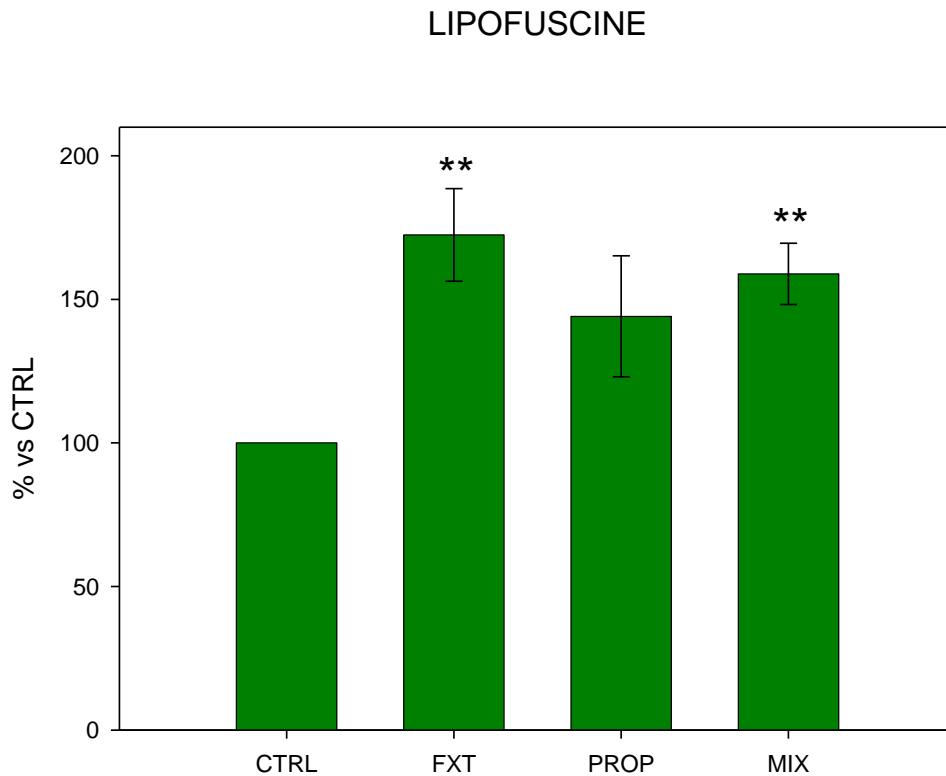


Fig. 4.4 Accumulo delle lipofuscine in molluschi esposti a fluoxetina, propranololo e alla miscela dei due farmaci. ** $p < 0,01$. I risultati sono espressi in % rispetto al controllo.

La percentuale delle lipofuscine nei mitili esposti per 7 giorni a fluoxetina (0,3 ng/L) propranololo (0,3 ng/L) e alla miscela dei due farmaci (fig. 4.4) mostra un significativo aumento nei lisosomi dei mitili esposti alla fluoxetina e alla mix rispetto al controllo. Si osserva comunque un aumento, anche se non significativo, delle lipofuscine nelle ghiandole digestive dei mitili esposti al propranololo.

4.5 DETERMINAZIONE DELLA MALONDIALDEIDE (MDA)

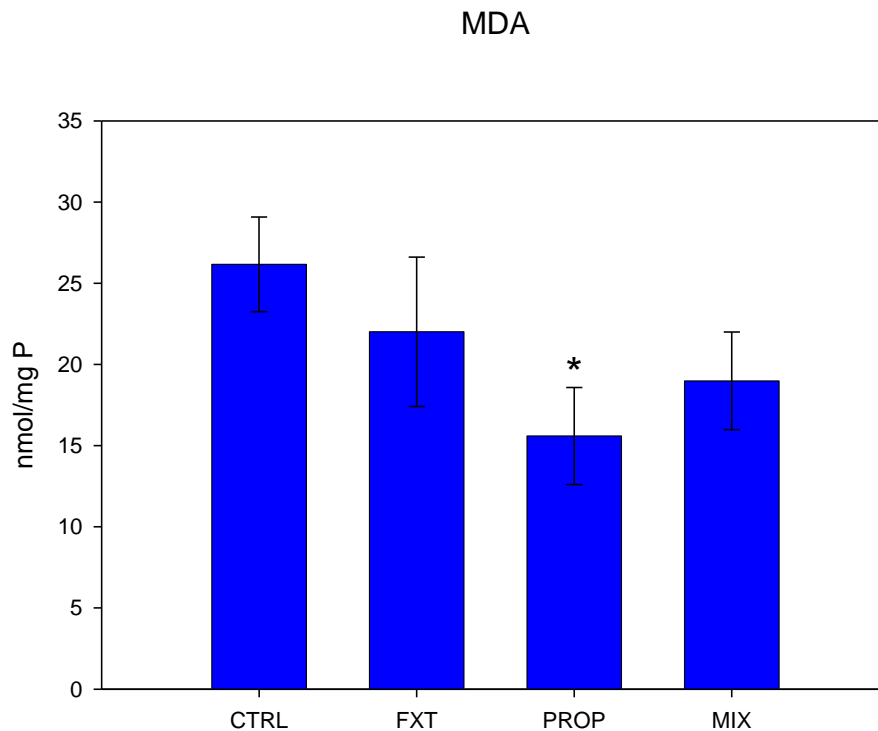


Fig. 4.5 Determinazione della malondialdeide in molluschi esposti a fluoxetina, propranololo e alla miscela dei due farmaci.
* $p < 0,05$. I risultati sono espressi in nmol/mgP.

La determinazione della malondialdeide nelle ghiandole digestive dei mitili esposti per 7 giorni a fluoxetina (0,3 ng/L) propranololo (0,3 ng/L) e alla miscela dei due farmaci è illustrata nella fig. 4.5. Si osserva una differenza significativa della determinazione della malondialdeide nei mitili esposti a propranololo rispetto al controllo, mentre non sono state rilevate differenze nei mitili esposti a fluoxetina e alla mix rispetto al controllo.

4.6 SAGGI ENZIMATICI

4.6.1 Determinazione dell'attività della glutatione s-transferasi (GST)

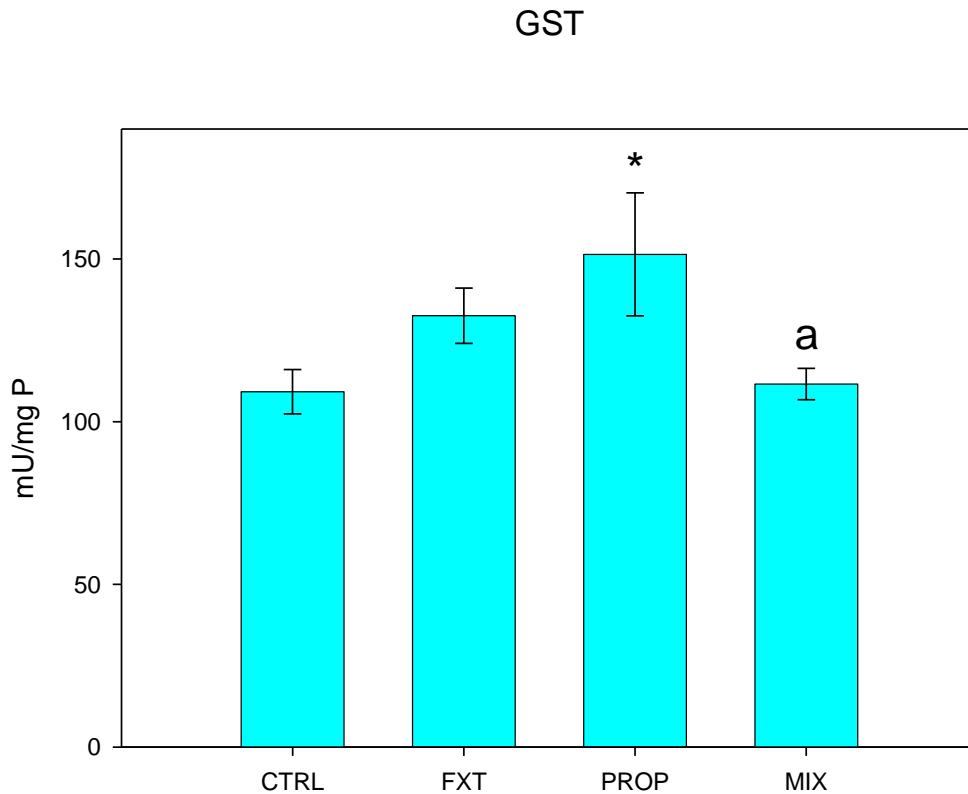


Fig. 4.6 Determinazione dell'attività della GST in molluschi esposti a fluoxetina, propranololo e alla miscela dei due farmaci. * $p < 0,05$; a: $p < 0,05$ propranololo rispetto alla mix. I risultati sono espressi in mU/mgP.

L'attività della GST nelle ghiandole digestive dei mitili esposti per 7 giorni a fluoxetina (0,3 ng/L) propranololo (0,3 ng/L) e alla miscela dei due farmaci è illustrata nella fig. 4.6. Si può osservare una differenza significativa dell'attività della GST nei mitili esposti al propranololo rispetto al controllo, ma non sono state rilevate differenze nei mitili esposti a fluoxetina e alla mix rispetto al controllo. L'ANOVA ha inoltre riscontrato una differenza significativa dell'attività della GST nei mitili esposti al propranololo rispetto alla mix.

4.6.2 Determinazione dell'attività della Catalasi

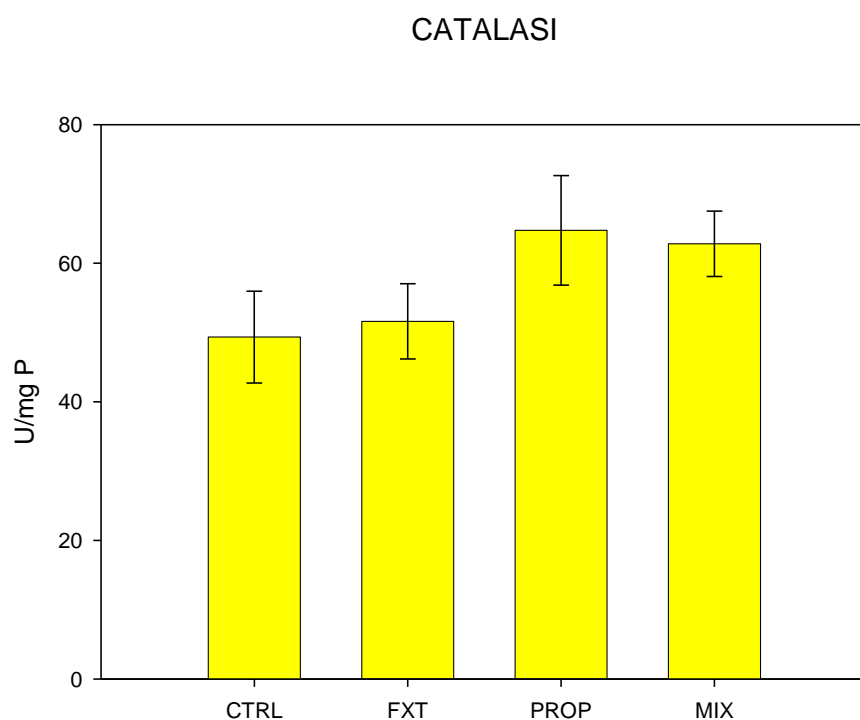


Fig. 4.7 Determinazione dell'attività della Catalasi in molluschi esposti a fluoxetina, propranololo e alla miscela dei due farmaci. I risultati sono espressi in U/mgP.

L'attività della catalasi nelle ghiandole digestive dei mitili esposti per 7 giorni a fluoxetina (0,3 ng/L) propranololo (0,3 ng/L) e alla miscela dei due farmaci è illustrata nella fig. 4.7. Non sono state riscontrate differenze nella determinazione dell'attività della catalasi nei vari trattamenti rispetto al controllo e tra di loro.

4.6.3 Determinazione dell'attività dell'etossiresorufina-o-deetilasi (EROD)

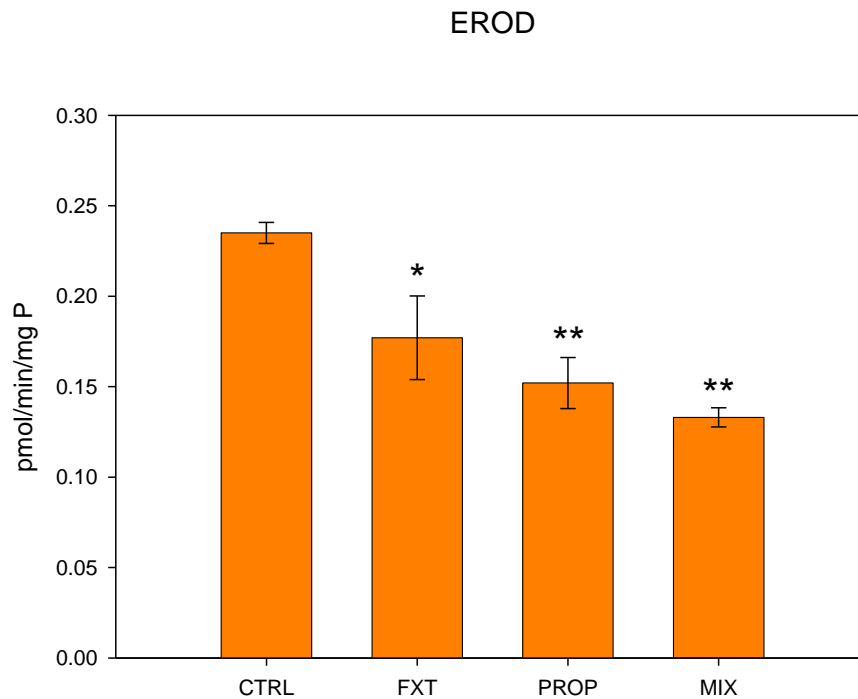


Fig. 4.8 Attività dell'EROD in molluschi esposti a fluoxetina, propranololo e alla miscela dei due farmaci. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. I risultati sono espressi in pmol/min/mgP.

L'attività dell'EROD nelle ghiandole digestive dei mitili esposti per 7 giorni a fluoxetina (0,3 ng/L) propranololo (0,3 ng/L) e alla miscela dei due farmaci è illustrata nella fig. 4.8. Si osserva una diminuzione significativa dell'attività dell'EROD nei mitili esposti a fluoxetina, propranololo e miscela dei due farmaci rispetto al controllo.

4.6.4 Determinazione dell'attività della dibenzilfluoresceina (DBF)

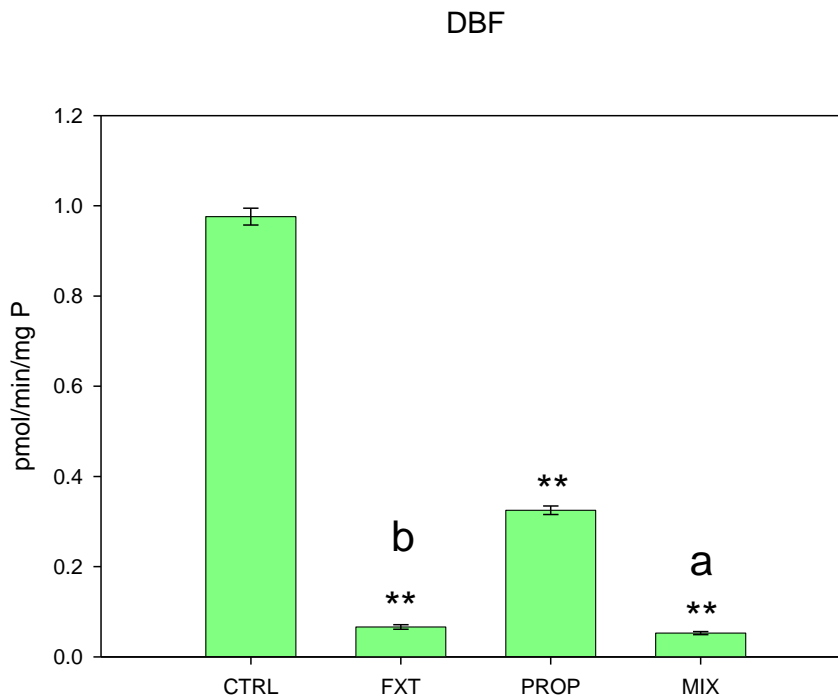


Fig. 4.9 Attività del DBF in molluschi esposti a fluoxetina, propranololo e alla miscela dei due farmaci. **: $p < 0,01$ rispetto al controllo; a: $p < 0,01$ propranololo rispetto alla mix ; b: $p < 0,05$ propranololo rispetto alla fluoxetina. I risultati sono espressi in pmol/min/mgP.

L'attività del DBF nelle ghiandole digestive dei mitili esposti per 7 giorni a fluoxetina (0,3 ng/L) propranololo (0,3 ng/L) e alla miscela dei due farmaci è illustrata nella fig. 4.9. Si osserva una diminuzione altamente significativa dell'attività del DBF nei mitili esposti alla fluoxetina, propranololo e miscela dei due farmaci rispetto al controllo. L'ANOVA ha riscontrato una differenza altamente significativa ($p < 0.01$) dell'attività del DBF nei mitili esposti al propranololo rispetto ai mitili esposti alla mix ed una differenza significativa ($p < 0,05$) dell'attività dell'EROD nei mitili esposti al propranololo rispetto alla fluoxetina.

4.7 DETERMINAZIONE DEL DANNO AL DNA

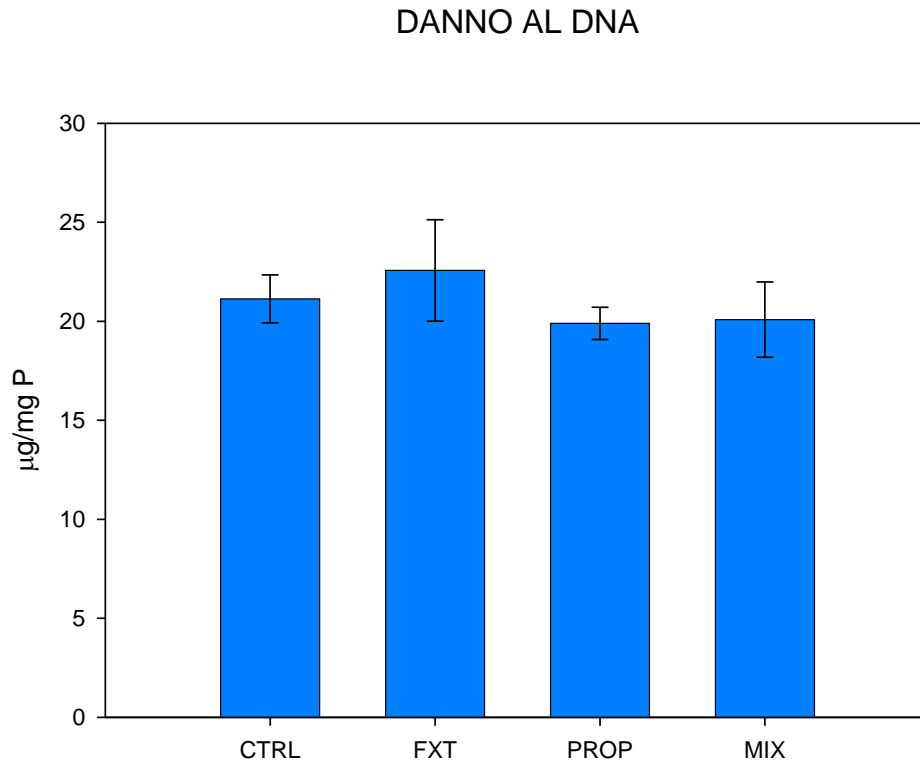


Fig. 4.10 Determinazione del danno al DNA in molluschi esposti a fluoxetina, propranololo e alla miscela dei due farmaci. I risultati sono espressi in $\mu\text{g}/\text{mgP}$.

La determinazione del danno al DNA nelle ghiandole digestive dei mitili esposti per 7 giorni a fluoxetina (0,3 ng/L) propranololo (0,3 ng/L) e alla miscela dei due farmaci è illustrata nella fig. 4.10. Non sono state riscontrate differenze nella determinazione del danno al DNA nei vari trattamenti rispetto al controllo e tra di loro.

4.8 CORRELAZIONE TRA I VARI BIOMARKER

Tab. 4.1 Confronto e correlazione tra i biomarker. I valori dei coefficienti di correlazione variano da -1 (relazione negativa perfetta) a +1 (relazione positiva perfetta). Il valore 0 indica l'assenza di relazione lineare. Coefficienti di correlazione di Spearman tra i differenti biomarker. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

	LIS/CIT	LF	LN	CAT	GST	MDA	EROD	DBF	DNA	NRRA
LIS/CIT	1,000	0,103	0,235**	0,176	0,599*	-0,134	-0,442*	-0,635**	0,175	-0,603**
LF	0,103	1,000	0,160*	0,104	0,248	-0,065	-0,436**	-0,414**	0,030	-0,284
LN	0,235**	0,160*	1,000	-0,380	0,115	0,014	0,065	-0,185	0,315	-0,058
CAT	0,176	0,104	-0,380	1,000	0,162	0,173	-0,578*	-0,107	-0,317	-0,108
GST	0,599*	0,248	0,115	0,162	1,000	0,036	-0,507*	-0,032	0,173	-0,296
MDA	-0,134	-0,065	0,014	0,173	0,036	1,000	0,029	0,342	-0,034	0,198
EROD	-0,442*	-0,436**	0,065	-0,578*	-0,507*	0,029	1,000	0,448**	-0,219	0,613**
DBF	-0,635**	-0,414**	-0,185	-0,107	-0,032	0,342	0,448**	1,000	0,045	0,701**
DNA	0,175	0,030	0,315	-0,317	0,173	-0,034	-0,219	0,045	1,000	-0,190
NRRA	-0,603**	-0,284	-0,058	-0,108	-0,296	0,198	0,613**	0,701**	-0,190	1,000

I vari biomarker sono stati confrontati per individuare una correlazione tra di loro attraverso l'utilizzo del software SPSS (Tab. 4.1). Sono state rilevate le seguenti correlazioni:

- Percentuale del rapporto lisosomi/citoplasma: correlazione positiva altamente significativa con l'aumento dei lipidi neutri e significativa con l'aumento dell'attività della GST; correlazione negativa significativa con la diminuzione dell'attività dell'EROD e con NRRA e altamente significativa con la diminuzione dell'attività del DBF;

- Percentuale di lipofuscine: correlazione positiva significativa con l'aumento dei lipidi neutri; correlazione negativa altamente significativa con la diminuzione dell'attività dell'EROD e del DBF;
- Percentuale di lipidi neutri: correlazione positiva altamente significativa con l'aumento della percentuale del rapporto lisosomi/citoplasma e significativa con l'aumento della percentuale delle lipofuscine;
- Catalasi: correlazione negativa significativa con la diminuzione dell'attività dell'EROD;
- GST: Correlazione positiva significativa con l'aumento della percentuale del rapporto lisosomi/citoplasma e correlazione negativa significativa alla diminuzione dell'attività dell'EROD;
- EROD: correlato positivamente in modo altamente significativo con l'aumento dell'attività del DBF e l'aumento dell'NRRA; è correlato negativamente in modo significativo con l'aumento della percentuale del rapporto lisosomi/citoplasma e con l'attività della catalasi e della GST; è correlato negativamente in modo altamente significativo con l'aumento della percentuale delle lipofuscine;
- DBF: correlazione positiva in modo altamente significativo con l'aumento dell'NRRA e con la diminuzione dell'attività dell'EROD; correlazione negativa in modo altamente significativo con l'aumento della percentuale del rapporto lisosomi/citoplasma e l'aumento delle lipofuscine;
- NRRA: correlazione positiva in modo altamente significativo con la diminuzione dell'attività dell'EROD e DBF; e una correlazione negativa altamente significativa con l'aumento della percentuale del rapporto lisosomi/citoplasma.

CAP.5

DISCUSSIONE E
CONCLUSIONI

I test ecotossicologici di tipo acuto utilizzati per molto tempo per valutare la tossicità dei farmaci ambientali hanno riportato effetti soltanto a concentrazioni superiori a quelle ambientali; nei 2-3 anni più recenti tuttavia è stato messo in luce come, già a basse concentrazioni, alcuni farmaci modificano le attività riproduttive o il metabolismo di pesci e molluschi. Da qui è nata l'esigenza di studiare quale sia la possibile interazione dei residui dei farmaci con la fauna acquatica a concentrazioni compatibili con quelle ambientali, e valutare il meccanismo d'azione sfruttando per quanto possibile le conoscenze disponibili per i farmaci messi in commercio.

I farmaci sono composti disegnati per avere effetti terapeutici ai fini medici o veterinari attraverso specifici meccanismi d'azione. Negli organismi non bersaglio che risultano esposti ai residui dei farmaci in ambiente, queste sostanze potrebbero indurre effetti simili a quelli specifici nel caso i bersagli molecolari siano stati conservati durante l'evoluzione. Tuttavia, potrebbero avere effetti inattesi se i bersagli molecolari sono conservati ma hanno una differente funzione. Inoltre, i farmaci manifestano effetti collaterali, in genere se usati a dosi elevate o per lungo tempo, e molto spesso si tratta di effetti ossidanti. E' possibile che tali effetti siano indotti dai farmaci ambientali negli organismi non bersaglio, magari a basse dosi se questi animali sono più sensibili dell'uomo o degli animali di allevamento.

In parallelo con un altro lavoro volto a studiare i possibili effetti specifici degli stessi farmaci, lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare nei mitili i potenziali effetti indotti dalla fluoxetina (farmaco antidepressivo), dal propranololo (farmaco β -bloccante), o dalla loro miscela con riferimento a quelli classificati come secondari o irrilevanti nell'uomo. In particolare, è stata applicata un'ampia batteria composta di 10 biomarker, scegliendo principalmente indicatori di stress ossidativo. I possibili effetti dei farmaci sono stati valutati dopo esposizione dei mitili *Mytilus galloprovincialis* per 7 giorni a fluoxetina e propranololo alla concentrazione di 0,3 ng/L, scelta perché rappresentativa delle dosi inferiori dei due farmaci riscontrate in ambiente acquatico. Inoltre è stato valutato l'effetto della miscela delle due sostanze, considerando che i farmaci in ambiente sono sempre in combinazione con altri farmaci o altri contaminanti. Data la convergenza sul medesimo meccanismo di traduzione del segnale intracellulare, si può ipotizzare una interazione di fluoxetina e propranololo per quanto riguarda gli effetti specifici; questa tesi si è occupata di valutare eventuali effetti additivi o sinergici tra quelli non specifici (collaterali).

La batteria di biomarker ha fornito le seguenti risposte: attraverso il Neutral Red Retention Assay (NRRA) si nota che i tempi di destabilizzazione delle membrane lisosomiali degli emociti diminuiscono nei mitili esposti a fluoxetina, propranololo e alla miscela di questi due farmaci;

ricordiamo che tempi bassi di ritenzione del colorante all'interno dei lisosomi sono indicativi di condizioni di stress, in particolare di stress ossidativo (Viarengo *et al.*, 2007). Per quanto riguarda l'esposizione dei mitili alla fluoxetina, i dati ottenuti confermano i risultati dell'esposizione preliminare a diverse concentrazioni del farmaco condotta nel mese di giugno (dati non pubblicati) nel quale si osservavano gli stessi tempi di destabilizzazione della membrana lisosomiale degli emociti dei mitili esposti a tale farmaco a parità di concentrazione. Relativamente all'esposizione dei mitili al propranololo, i risultati confermano la diminuzione della integrità delle membrane lisosomiali negli organismi trattati, come descritto nel lavoro di Franzellitti *et al.*, 2010. Infine per quanto riguarda l'esposizione dei mitili alla miscela dei due farmaci possiamo osservare una diminuzione del tempo della integrità della membrana lisosomiale degli emociti dei mitili molto simile a quella dei mitili esposta alla fluoxetina portando a supporre che all'interno della miscela la destabilizzazione della membrana lisosomiale sia indotta maggiormente dalla fluoxetina, considerando la differenza significativa dei valori ottenuti in presenza dei due farmaci. I lisosomi sono piccoli organelli sferici presenti all'interno degli emociti, ma presenti in tutte le cellule, in grado di accumulare al loro interno sostanze tossiche ed inquinanti; il sistema lisosomiale è particolarmente sviluppato nei mitili, e, come detto, svolge importanti funzioni all'interno di questi organismi, come la digestione di residui intracellulari, la sottrazione di sostanze tossiche dall'ambiente cellulare, la detossificazione da sostanze xenobiotiche e partecipa alle risposte immunitarie dell'organismo (Bocchetti *et al.*, 2006). È stato riportato che il NRRA, ovvero la integrità delle membrane lisosomiali, è solo minimamente influenzato da fattori naturali, quali temperatura e salinità o non lo è affatto, mentre è fortemente influenzato dalla presenza di contaminanti nell'ambiente (Dailianis *et al.*, 2003). Molti xenobiotici (o i loro metaboliti) possono indurre stress ossidativo producendo specie reattive dell'ossigeno (ROS), e se la presenza di queste specie chimiche non viene contrastata adeguatamente da altre difese cellulari, esse entrano nei lisosomi. Questi, privi di difese antiossidanti, subiscono danno a livello della membrana. Per questi motivi la stabilità delle membrane lisosomiali è considerata un efficace indice del danno cellulare subito dai mitili in seguito all'esposizione ad agenti tossici. Inoltre la diminuzione della integrità delle membrane lisosomiali è direttamente correlata con la tossicità globale subita dalla cellula, il potenziale di sintesi proteica, e l'investimento nella crescita in pesci e mitili; nelle ostriche vi è una correlazione inversa con la vitalità delle larve (Moore *et al.*, 2004). Questo biomarker risulta pertanto particolarmente importante per la sua capacità predittiva sugli effetti a lungo termine della esposizione a farmaci.

La diminuzione della stabilità della membrana lisosomiale è associata inoltre ad un significativo incremento di autofagia e questo può causare una grande perdita di citoplasma. Nelle cellule delle ghiandole digestive nei mitili esposti a fluoxetina, propranololo e alla miscela dei farmaci, si può osservare un aumento della percentuale del rapporto lisosomi/citoplasma rispetto al controllo, anche se nei mitili esposti al propranololo non è statisticamente significativo. Questa risposta è indicativa di un aumento delle dimensioni dei lisosomi, in conseguenza all'aumento di lipofuscine e lipidi neutri che vengono inglobate e fagocitate dai lisosomi. Risulta inoltre una correlazione negativa del dato con la stabilità delle membrane lisosomiali; infatti all'aumentare della percentuale del rapporto lisosomi/citoplasma diminuisce la stabilità delle membrane lisosomiali. Questi risultati sono in accordo con molti studi di Moore (Moore, 2008; Moore *et al.*, 2008; Moore *et al.*, 2007) nel quale si afferma che l'autofagia lisosomiale è un meccanismo di difesa cellulare contro lo stress ossidativo indotto dagli inquinanti ambientali. In questo processo vengono inglobate all'interno dei lisosomi molecole come lipofuscine e lipidi neutri, prodotti di attacco ossidativo di proteine e lipidi che possono generare ulteriori specie reattive dell'ossigeno inibendo così la funzione lisosomiale.

La percentuale di accumulo delle lipofuscine infatti risulta essere maggiore nelle ghiandole digestive dei mitili esposti ai vari trattamenti, che mostrano però differenze significative rispetto al controllo solo nei mitili esposti alla fluoxetina e alla miscela dei due farmaci. La percentuale di accumulo dei lipidi neutri aumenta nei mitili esposti ai vari trattamenti; la statistica rivela una differenza altamente significativa nei mitili esposti alla fluoxetina e al propranololo rispetto al controllo, mentre i mitili esposti alla miscela risultano essere statisticamente diversi solo rispetto ai mitili esposti al propranololo; dall'analisi statistica questi due biomarker risultano inoltre correlati tra di loro. Questi risultati sono in accordo con lo studio effettuato da Martin-Diaz *et al.*, 2009 in cui si osservano accumuli di LF e LN in seguito a esposizione dei mitili a carbamazepina somministrata a concentrazioni ambientali.

Per meglio valutare lo stress ossidativo dei mitili esposti alla fluoxetina, propranololo e alla miscela dei due farmaci è stato utilizzato un biomarker di tossicità, quale il test della malondialdeide. La malondialdeide è un composto intermedio della perossidazione lipidica: un aumento dei suoi livelli negli organismi è correlato ad un calo della qualità dell'ambiente in cui essi vivono (Box *et al.*, 2007). L'accumulo della malondialdeide nelle ghiandole digestive dei mitili esposte alla fluoxetina e alla miscela dei due farmaci non mostra differenza con il controllo mentre nei mitili esposti a propranololo l'accumulo risulta inferiore rispetto al controllo con un differenza significativa; si può ipotizzare quindi che la malondialdeide sia stata degradata velocemente e trasformata nei prodotti

finali della perossidazione lipidica come le lipofuscine (LF) e i lipidi neutri (LN). Come detto, gli organismi possiedono enzimi antiossidanti che hanno lo scopo di difendere le cellule dagli attacchi da parte dei ROS, come la catalasi e la glutazione S-transferasi (GST). La catalasi è un enzima che catalizza la conversione del perossido di idrogeno ad acqua e ossigeno, mentre la GST è un enzima coinvolto nella fase II nel metabolismo degli xenobiotici catalizzando la coniugazione delle molecole tossiche con il glutatione. L'attività della catalasi nelle ghiandole digestive dei mitili esposti ai trattamenti mostra un aumento rispetto al controllo anche se tali differenze non risultano statisticamente significative rispetto al controllo. Nel caso della fluoxetina ci si aspettava un aumento dell'attività della catalasi, data la destabilizzazione delle membrane lisosomiali osservata mediante NRRA, ma così non è stato; anche negli organismi esposti al propranololo, l'attività della catalasi è molto simile a quella del controllo, risultato che è stato confrontato e confermato dal lavoro di Franzellitti *et al.*, 2010 nel quale non si osservano differenze significative rispetto al controllo. Analogamente, non si osserva un aumento dell'attività della catalasi nei mitili esposti alla miscela dei due farmaci. I risultati dell'attività della GST non mostrano un aumento dell'attività dell'enzima nelle ghiandole digestive dei mitili esposti a fluoxetina, mentre nelle ghiandole digestive dei mitili esposti a propranololo si osserva una differenza significativa rispetto al controllo come confermato nel lavoro di Franzellitti *et al.*, 2010 e una differenza significativa rispetto all'attività della GST negli organismi esposti alla miscela dei due farmaci che a sua volta non mostra differenze con il controllo. La ghiandola digestiva è il tessuto maggiormente coinvolto nella detossificazione da xenobiotici e l'aumento dell'attività della GST nei mitili esposti a propranololo indica che è stata attivata una difesa detossificante e antiossidante. La scarsa attività della catalasi, invece, potrebbe aver portato ad una diminuzione dell'azione di difesa contro gli agenti ossidanti e di conseguenza ad un aumento dello stress ossidativo causando così la perossidazione lipidica delle membrane lisosomiali. È stato dimostrato che questi test enzimatici sono adatti per il monitoraggio degli effetti degli inquinanti negli organismi sentinella. La risposta enzimatica alla tossicità chimica mostra tuttavia un trend a campana con un incremento iniziale dovuta alla sintesi degli enzimi, seguita da una diminuzione dell'attività enzimatica dovuto ad un maggiore tasso catabolico e/o dalla diretta inibizione dell'attività delle molecole enzimatiche, da parte dei componenti tossici (Viarengo *et al.*, 2007). Per questa ragione, in questa tesi i saggi enzimatici sono stati usati in associazione con altri biomarker che rendono più chiare l'interpretazione del significato fisiologico del cambiamento osservato nell'attività degli enzimi antiossidanti.

Oltre ad avere sistemi di difesa contro gli attacchi di molecole ossidanti, questi organismi possiedono meccanismi di detossificazione nel quale le sostanze esogene grazie agli enzimi della

famiglia del citocromo P450 (o monoossigenasi a funzione mista, MFO), possono essere trasformate o coniugate ad altre molecole, rendendole innocue. Gli enzimi trattati in questa tesi sono l'etossiresorufina-O-dietilasi (EROD) e dibenzilfluoresceina (DBF), che intervengono nella fase I del metabolismo dei farmaci (fase di trasformazione). Dai risultati ottenuti si osserva un'attività molto bassa, in relazione alla quantità di prodotto generato da ciascun enzima. Nel caso dell'EROD si osserva un'attività enzimatica più bassa del controllo nelle ghiandole digestive dei mitili esposti a tutti e tre i trattamenti, risultato in contraddizione con altri studi; Martin-Diaz *et al.*, 2007 e Pereira *et al.*, 2011 affermano che l'attività dell'EROD aumenta nelle ghiandole digestive di molluschi esposti a farmaci. Studi condotti da Laville *et al.*, 2003 sul fegato di trota (*Onchorynchus mykiss*) affermano invece che l'esposizione acuta di questi organismi a fluoxetina provoca l'inibizione dell'attività dell'EROD, mentre l'esposizione acuta al propranololo mostra al contrario l'induzione dell'attività enzimatica. Anche per il DBF si osserva una bassissima attività enzimatica nelle ghiandole digestive dei mitili esposti ai trattamenti, in disaccordo con il lavoro di Pereira *et al.*, 2011 nel quale l'attività di questo enzima sembra correlato alla presenza di inquinanti in ambiente marino. Tuttavia negli studi condotti da Viarengo *et al.*, 2007 si arriva alla conclusione che gli enzimi del sistema delle monoossigenasi a funzione mista possono essere influenzati da fattori biologici (come età, sesso) e i parametri ambientali (temperatura), ma la presenza di metalli pesanti, stress ossidativo e residui di farmaci in ambiente possono inibire in modo significativo l'attività di questi enzimi che mostrano la caratteristica risposta a campana nel quale all'aumentare della concentrazione degli inquinanti e del tempo di esposizione, si ha la diminuzione dell'attività enzimatica fino ad arrivare all'inibizione.

In questo studio non è stato riscontrato alcun danno al DNA, dai risultati ottenuti non si osservano differenze nei mitili esposti a fluoxetina, propranololo e miscela dei due farmaci rispetto al controllo. È evidente, dai risultati ottenuti, che nei mitili trattati con fluoxetina, propranololo e la miscela dei due farmaci si è verificato un forte stress ossidativo. Le specie reattive dell'ossigeno hanno la capacità di reagire con la maggior parte delle macromolecole cellulari, provocando eventualmente anche il danneggiamento della molecola di DNA. Nel nostro studio non si è verificato, anche se non escludiamo che questo possa avvenire per esposizioni più prolungate.

Riepilogando, i risultati ottenuti in questo lavoro di tesi indicano che sia la fluoxetina, che il propranololo e la miscela dei due farmaci provocano stress ossidativo, aggravato probabilmente dalla mancata attivazione o inibizione di enzimi che provvedono al metabolismo delle molecole esogene. La fluoxetina ad una concentrazione di 0,3 ng/L è in grado di provocare nei mitili la

destabilizzazione della membrana lisosomiale, ulteriormente confermato dall'accumulo di lipidi neutri e lipofuscine, che contribuiscono all'aumento del rapporto lisosomi/citoplasma. La mancata stimolazione dell'attività degli enzimi antiossidanti, catalasi e GST ha contribuito alla mancata protezione dalle specie reattive dell'ossigeno, e che ha portato quindi al progressivo aumento di stress ossidativo, con conseguente perossidazione lipidica. I valori bassi della malondialdeide fanno presupporre che la perossidazione lipidica sia avanzata al punto che i composti intermedi sono stati trasformati nei prodotti finali (LF e LN) e fagocitati dai lisosomi. L'attività degli enzimi coinvolti nella fase di detossificazione degli xenobiotici, quali EROD e DBF è risultata bassa, probabilmente a causa di una inibizione del farmaci sul sistema delle monoossigenasi. L'esposizione di mitili per una settimana alla fluoxetina non ha comportato danni al DNA.

L'esposizione di mitili al propranololo alla concentrazione di 0,3 ng/L, analogamente alla fluoxetina ha provocato stress ossidativo e probabilmente l'inattivazione di alcuni enzimi coinvolti nei sistemi di detossificazione delle molecole esogene. Mediante il Neutral Red Retention Assay è stata rilevata una notevole destabilizzazione delle membrane lisosomiali, supportato dalla presenza dei prodotti finali della perossidazione lipidica come le LF che vengono autofagocitati dai lisosomi contribuendo all'aumento del rapporto lisosomi/citoplasma. Un'osservazione particolare è il rilevante aumento dei LN, che fa pensare che il propranololo sia particolarmente efficace nell'alterare il metabolismo dei lipidi. La bassa attività della catalasi non riesce ad evitare danni causati dallo stress ossidativo che viene però in parte mitigato dalla attività della GST che risulta essere alta rispetto agli organismi di controllo. Come nell'esposizione alla fluoxetina, anche nell'esposizione dei mitili al propranololo si evidenzia una bassa attività degli enzimi deputati alla trasformazione degli xenobiotici. L'esposizione di mitili per una settimana al propranololo non ha comportato danni al DNA.

L'effetto sui mitili esposti alla miscela di fluoxetina e propranololo è in genere significativamente differente dall'effetto del propranololo e più simile a quello della fluoxetina, anche se in alcuni casi (LF, MDA, GST) la presenza del propranololo sembra ridurre quantitativamente l'effetto della fluoxetina. La miscela produce tuttavia chiare evidenze di stress ossidativo, con destabilizzazione delle membrane lisosomiali e aumento significativo del rapporto lisosomi/citoplasma. I valori di malondialdeide simili al controllo possono far presupporre che la perossidazione lipidica sia andata oltre e che i composti intermedi siano stati trasformati nei prodotti finali del processo (LF) e fagocitati dai lisosomi. Si rileva una bassa attività degli enzimi coinvolti nella detossificazione delle molecole esogene, EROD e DBF, e in questo caso l'effetto è maggiore rispetto a quello dei farmaci

da soli. L'esposizione di mitili per una settimana alla miscela di fluoxetina e di propranololo non ha comportato danni al DNA.

In conclusione la fluoxetina e il propranololo, a concentrazioni rappresentative dell' intervallo inferiore riscontrato in ambiente, singolarmente o in miscela inducono alterazioni dello stato fisiologico dei mitili esposti ai farmaci per 7 giorni. Di grande interesse è la forte riduzione della stabilità delle membrane lisosomiali, che esperimenti preliminari non inclusi in questa tesi mostrano essere un effetto dose-dipendente. Data la dimostrata relazione tra la riduzione della stabilità delle membrane lisosomiali e l'investimento degli organismi nella crescita, nonché con la loro vitalità, questi dati indicano la elevata vulnerabilità dei mitili esposti a farmaci anche a concentrazioni ambientali. Nel loro insieme, le alterazioni dei biomarker sono riconducibili ad una sindrome di stress ossidativi. Limitatamente alla combinazione testata, i due farmaci non mostrano chiari effetti di interazione.

CAP.7

BIBLIOGRAFIA

- ❖ Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2004. *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli pp.789-795.
- ❖ Altamura, A.C., Moro, A.R., Percudani, M., 1994. Clinical pharmacokinetics of fluoxetine. *Clin. Pharmacokinet.* 26, 201-214.
- ❖ Banni, M., Dondero, F., Jebali, J., Guerbej, H., Boussetta, H., Viarengo, A., 2007. Assessment of heavy metal contamination using real-time PCR analysis of mussel metallothionein mt10 and mt20 expression: a validation along the Tunisian coast. *Biomarkers* 12, 369-383.
- ❖ Bargagli, B., Cruscanti, M., Leonzio, C. e Bacci E., 1998. I bioindicatori. In: Vighi M., Bacci E., *Ecotossicologia*. UTET, Torino, Italia, pp. 237.
- ❖ Barnes, K.K., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Zaugg, S.D., Meyer, M.T., Barber L.B., 2008. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States-I) Groundwater, *Sci. Total Environ.* 402, 192-200.
- ❖ Bartels, P., Tümpling, W.Jr., 2007. Solar radiation influence on the decomposition process of diclofenac in surface waters, *Sci. Total Environ.* 374, 143-155.
- ❖ Bendz, D., Paxeus, N.A., Ginn, T.R. Loge, F.J., 2005. Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden, *J. Hazard. Mater.* 122, 195-204.
- ❖ Benotti, M.J., Trenholm, R.A., Vanderford, B.J., Holady, J.C., Stanford, B.D., Snyder, S.A., 2009. Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water, *Environ. Sci. Technol.* 43, 597-603.
- ❖ Bocchetti R., Regoli F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65, 913–921.
- ❖ Bonamassa, B., 2009. Manipolazione del metabolismo degli xenobiotici da frutta convenzionale ed attività chiemiopreventiva. Tesi di dottorato di ricerca in farmacologia e tossicologia. Università di Bologna.
- ❖ Boreen, A.L., Arnold, W.A., McNeill, K., 2003. Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: a review, *Aquat. Sci.* 65, 320-341.
- ❖ Box, A., Sureda, A., Falgani, F., Pons, A., Deudero, S., 2007. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 146, 531-539.

- ❖ Brooks, B.W., Chambliss, C.K., Stanley, J.K., Ramirez, A., Banks, K.E., Johnson, R.D., Lewis, R.J., 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 464-469.
- ❖ Brown, M.O. e Tobar, V.G., 2004. Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases. *Rev. Méd. Chile.* 132, 85-94.
- ❖ Bucheli, T.D. and Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit Rev Environ Sci Technol* 25, 201-68.
- ❖ Buxton, G.V., Greenstock, C.L., Helman, W.P., Ross, A.B., 1988. Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals. *Phys. Chem. Ref. Data* 17, 513-517.
- ❖ Cadet, J., Berget, M., Douki, T., Ravanat, J.L., 1997. Oxidative damage to DNA: formation measurements, and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 131, 1-87.
- ❖ Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., 2003. Strategic survey of therapeutic drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy, *Environ. Sci. Technol.* 37 1241–1248.
- ❖ Casini, S., AA 2007-2008. *Bioindicatori e Biomarkers*. Dispensa.
- ❖ Cerutti, P.A., 1985. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227, 375-381.
- ❖ Christensen, A.M., Markussen, B., Baun, A., Halling-Sorensen, B., 2009. Probabilistic environmental risk characterization of pharmaceuticals in sewage treatment plant discharges. *Chemosphere* 77, 351-358.
- ❖ Cleuvers, M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett.* 142(3), 185-94.
- ❖ Commandeur, J.N.M., Stijntjes, G.J., Vermeulen, N.P.E., 1995. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacol. Rev.* 47, 271-330.
- ❖ Cooper E.R., Siewicki, T.C., Philips, K., 2008. Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Sci. Total. Environ.* 398, 26-33.
- ❖ Cunha, E.M., Machado, J., 2001. Parturition in *Anodonta cygnea* induced by selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Can J Zool* 79, 95-100.
- ❖ Dailianis S., Domouhtsidou G.P., Raftopoulou E., Kaloyianni M., Dimitriadis V.K.; “Evaluation of neutral red retention assay, micronucleus test, acetylcholinesterase activity and

- a signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring". *Marine Environmental Research* 56 (2003) 443–470.
- ❖ Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle changes? *Environ. Health Perspect.* 107, 907-938.
 - ❖ De Brabander, H.F., De Wulf, E., Janssen, C.R., Noppe, H., Van Caeter, P., Vanden Bussche, J., Vanhaecke, L., Verheyden, K., Wille, K., 2010. Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 1797-1808.
 - ❖ Depledge, M.H., 1994. The rational basis for the use of biomarkers as ecotoxicological tools. In *non-destructive Biomarkers in vertebrates*, eds Fossi, M. C. and Leonzio C.. Lewis Publisher, Boca Raton, Florida.
 - ❖ Di Giulio, R.T., Washburn, P.C., Wenning, R.J., Winston, G.W., Jewell, C.S., 1989. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1103-1123.
 - ❖ Dizdaroglu, M., 1993. Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. In: Halliwell, B., Aruoma, O.I. (Eds.), *DNA and Free Radicals*. Ellis Horwood, Ltd., Chichester, pp. 19-39.
 - ❖ Donnini, F., Dinelli, E., Sangiorgi, F., Fabbri, E., 2007. A biological and geochemical integrated approach to assess the environmental quality of a coastal lagoon (Ravenna, Italy). *Environ. Int.* 33, 919-928.
 - ❖ Eastman, A., Barry, M.A., 1992. The origin of DNA breaks: a consequence of DNA damage. DNA repair or apoptosis? *Cancer Investig.* 10, 229-240.
 - ❖ Esterbauer, H., 1985. Lipid peroxidation products: formation, chemical properties and biological activities. In: Pli, G., Cheeseman, K.H., Dianzani, M.U., Slater, T.F. (Eds.), *Free Radicals in Liver Injury*. IRL Press, Oxford, pp. 29–47.
 - ❖ Fent K., Weston A.A., Caminada D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol.* 76, 122-159.
 - ❖ Ferreira, A., Dolder, H., 2003. Cytochemical study of spermiogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia, Squamata). *Acta Histochem.* 105, 339-352.
 - ❖ Fick, J., Lindberg, R.H., Tysklind, M., Larsson, D.G., 2010. Predicted critical environmental concentrations for 500 pharmaceuticals. *Regul Toxicol Pharmacol* 58(3), 516-23.

- ❖ Fong, P.P., Duncan, J., Ram, J.L., 1994. Inhibition and sex specific induction of spawning by serotonergic ligands in the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas). *Experientia* 50, 506-509.
- ❖ Fong, P.P., Wade, S., Rostafin, M., 1996. Characterization of serotonin receptor mediating parturition in fingernail clams *Sphaerium* (Musculium) spp. from eastern North America. *J Exp Zool* 275, 326-330.
- ❖ Fossi, M.C., 1998. Biomarkers: strumenti diagnostici e prognostici di salute ambientale. In: Vighi e Bacci (eds), *Ecotossicologia*, UTET: 60- 73.
- ❖ Fossi, M.C., 2000. Biomarkers. Strumenti di diagnosi e prognosi ambientale. Rosini Editrice s.r.l., Firenze, Italia.
- ❖ Fossi, M.C., Leonzio, C. 1994. Nondestructive Biomarkers in Vertebrates. Lewis Publishers, CRC Press, United States. pp. 345.
- ❖ Franzellitti, S., Buratti, S., Donnin, F., Fabbri, E., 2010. Exposure of mussel to a polypate environment: Insights into the stress syndrome development. *Comp. Biochem. Physiol. C* 152, 24-33.
- ❖ 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*. *Aquat.Toxicol.* 101, 299-308.
- ❖ Fuller, R.W., Snoddy, H.D., Krushinski, J.H., Robertson, D.W., 1992. Comparison of norfluoxetine enantiomers as serotonin uptake inhibitors in vivo. *Neurpharmacology* 31, 997-1000.
- ❖ George, S.G., 1994. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*. Lewis Publishers, CRC press, pp. 37- 85.
- ❖ George, S.G., Viarengo, A., 1985. A model for heavy metal homeostasis and detoxication in mussel. *Mar. Pollut. Physiol.: Recent Advances* 125-143.
- ❖ Gibbons, M.C., Castagna, M., 1984. Serotonin as an inducer of spawning in six bivalve species. *Aquaculture* 40, 189-191.
- ❖ Glassmeyer, S.T., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Focazio, M.J., 2008. Environmental presence and persistence of pharmaceuticals: an overview, in: D.S. Aga (Ed.), *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*, CRC Press, Taylor and Francis, pp. 3-52.

- ❖ Goeptar, A.R., Scheerens, H., Vermeulen, N.P.E., 1995. Oxygen reductase and substrate reductase activity of cytochrome P450. *Crit. Rev. Toxicol.* 25, 25- 65.
- ❖ Gómez, M.J., Martínez Bueno, M.J., Lacorte, S., Fernández-Alba, A.R., Agüera, A., 2007. Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast, *Chemosphere* 66, 993-1002.
- ❖ Gosling, E. M., 1985. The systematic status of *Mytilus galloprovincialis* in western Europe: a review. *Malacologia*, 25, 551-568.
- ❖ Hahn, M.E. and Karchner, S.I., 1995. Evolutionary conservation of the vertebrate Ah (dioxin) receptor: amplification and sequencing of the PAS domain of a teleost Ah receptor cDNA. *Biochem J* 310,383-7.
- ❖ Halling-Sørensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H.C., Jørgensen, S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-a review, *Chemosphere* 36, 357-393.
- ❖ Halliwell, B., Aruoma, O.I., 1991. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281, 9-19.
- ❖ Halliwell, B., Gutteridge, 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed.. Oxford University Press, Oxford, UK.
- ❖ Heberer, T., 2002. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicol. Lett.* 131, 5-17.
- ❖ Hernando, M.D., Mezcuá, M., Fernández-Alba, A.R., Barcelò, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta.* 69,334–342
- ❖ Hiemke, C., Härtter, S., 2000. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol. Therapeut.* 85, 11-28.
- ❖ Hilton, M.J., Thomas, K.V., 2003. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1015, 129-141.
- ❖ Hirai, S., Kishimoto, T., Kadam, A.L., Kanatani, H., Koide, S.S., 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. *J Exp Zool* 245, 318-321.

- ❖ Huggett, D.B., Brooks, B.W., Peterson, B., Foran, C.M., Schlenk, D., 2002. Toxicity of select beta adrenergic receptor-blocking pharmaceuticals (β -blockers) on aquatic organisms. *Arch Environ Contam Toxicol* 43(2): 229-35.
- ❖ Jones, O.A.H., Voulvoulis, N., Lestner, J.N., 2004. Potential Ecological and Human Health Risks Associated With the Presence of Pharmaceutically Active Compounds in the Aquatic Environment. *Crit. Rev. Toxicol.* 34, 335-350
- ❖ Kagley, A.N., Snider, R.G., Krishnakumar, P.K., Casillas, E., 2003. Assessment of seasonal variability of cytochemical responses to contaminant exposure in the blue mussel *Mytilus edulis* (complex). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44(1), 43-52.
- ❖ Kappas, A. and Alvares, A.P., 1975. How the liver metabolizes foreign substances. *Sci. Am.*, 232, 60.
- ❖ Kim, J.-W., Jang, H.-S., Kim, J.-G, Ishibashi, H., Hirano, M., Nasu, K., Ichikawa, N., Takao, Y., Shinohara, R., Arizono, K., 2009. Occurrence of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) in surface water from Mankyung River, South Korea, *J. Health Sci.* 55, 249-258.
- ❖ Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M, Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance, *Environ. ci. Technol.* 36, 1202-1211.
- ❖ Koutsouba, V., Heberer, Th., Fuhrmann, B., Schmidt-Baumler, K., Tsipi, D., Hiskia, A., 2003. Determination of polar pharmaceuticals in sewage water of Greece by gas chromatography-mass spectrometry, *Chemosphere* 51, 69-75.
- ❖ Kümmerer, K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources-a review, *Chemosphere* 45, 957-969.
- ❖ Kurz, T., Terman, A., Gustaffsson, B., Brunk, U.T., 2008. Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *Bioch. Biophys. Acta.* 1780, 1291-1303.
- ❖ Lajeunesse, A., Gagnon, C., Sauvé, S., 2008. Determination of basic antidepressants and their N-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solidphase extraction and liquid chromatography-tandem mass, *Anal. Chem.* 80, 5325-5333.
- ❖ Laville, N., Ait-Aissa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M., 2003. Effects of human pharmaceutical on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicol.* 196, 41-55.

- ❖ Lech, J.J., Vodcnik, M.J., 1985. Biotransformation. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology; Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA, pp. 526-557.
- ❖ Lindqvist, N., Tuhkanen, T., Kronberg, L., 2005. Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters, *Water Res.* 39, 2219-2228.
- ❖ Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C.A., 2009. *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli pp.399.
- ❖ Lowe, D. M., 1988. Alterations in the cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46, 91-100.
- ❖ Lowe, D. M., Moore, M. N., and Clarke, K. R., 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: Quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquatic Toxicol.* 1, 213-226.
- ❖ Lowe, D.M., Pipe, R.K., 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: as in vitro study. *Aquat. Toxicol.* 30, 357-365.
- ❖ Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- ❖ Lüllman-Rauch, R., 1979. Drug-induced lysosomal storage disorders. *Lysosomes in Biology and Pathology*, 6, pp. 49–130.
- ❖ Martin-Diaz, M.L., Blasco, J., Sales, D., DelValls, T.A., 2007. Field validation of a battery of biomarkers to assess sediment quality in Spanish ports. *Environ. Pollut.* 115, 631-640
- ❖ Martin-Diaz, L., Franzellitti, S., Buratti, S., Valbonesi, P., Capuzzo, A., Fabbri, E., 2009. Effect of environmental concentrations of the antiepileptic drug carbamazepine on biomarker and cAMP-mediated cell signaling in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 94, 177-185
- ❖ McCarthy, J.F., Halbrook, R.S., Shugart, L.R., 1991. Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarker based biomonitoring capability. Publication no. 3072, ORNL/TM- 11783. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.
- ❖ Mengoli, A., 1998. Aspetti morfo-funzionali dei mitili. *Laguna* 4, 13-19.
- ❖ Mimeault, C., Trudeau, V.L., Moon, T.W., 2006. Waterborne gemfibrozil challenges the hepatic antioxidant defense system and down-regulates peroxisome proliferator-activated

receptor beta (PPARbeta) mRNA levels in male goldfish (*Carassius auratus*). Toxicology 228, 140-150.

- ❖ Ming-Ho Yu., 2005 Environmental Toxicology Biological and Health Effects of Pollutants. Biotransformation- Metabolism of xenobiotics. Second Edition CRC Press.
- ❖ Moldovan, Z., 2006. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania, Chemosphere 64, 1808-1817.
- ❖ Moore, M. N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in mollusks to environmental and experimental exposure to xenobiotics. Mar. Ecol. Prog. Ser. 46, 81–89.
- ❖ Moore, M.N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel, *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. Cell Tissue Res. 175, 279-287.
- ❖ Moore, M.N., 2008. Autophagy as a secondal level protective process in conferring resistance to environmentally-induced oxidative stress. Landes Bioscience. 4(2), 254-256.
- ❖ Moore, M.N., and Clarke, K. R., 1982. Use of microstereology and cytochemical staining to determine the effects of crude oil-derived aromatic hydrocarbons on lysosomal structure and function in a marine bivalve mollusk, *Mytilus edulis*. Histochem. J. 14, 713-718.
- ❖ Moore, M.N., Koehler, A., Lowe, D., Viarengo, A., 2008. Lysosomes and autophagy in aquatic animals. Methods in enzymology. 451, 581-620.
- ❖ Moore, M.N., Viarengo, A., Donkin, P., and Hawkins, A.J.S., 2007. Autophagic and lysosomal reactions to stress in the hepatopancreas of blue mussels. Aquatic. Toxicol. 84, 80-91.
- ❖ Moore, N.M., Depledge, M.H., Readman, J.W., Leonard, D.R.P., 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental managment. Mutation Research. 552, 247-268.
- ❖ Mulder, G.J., Coughy, M.W.H., Burchell, B., 1990. Glucuronidation. In: Mulder, G.J. (Ed.), Conjugation Reactions in Drug Metabolism; an Integrated Approach. Taylor and Francis, London.
- ❖ Nebert, D.W., Puga. A. and Vasiliou, V., 1993. Role of the Ah receptor and the dioxin-inducible [Ah] gene battery in toxicity, cancer, and signal transduction. Ann N Y Acad Sci 685, 624-40.

- ❖ Nikolau, A., Meric, S., Fatta, D., 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal. Bioanal. Chem.* 387,1225-1234
- ❖ NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.* 74, 3-9.
- ❖ Oakes, D.K., Coors, A., Escher, B.I., Fenner, k., Garric, J., Gust, M., Knacker, T., Ku"ster, A., Kussatz, C., Metcalfe, C.D., Monteiro, S., Moon, T.W., Mennigen, J., Parrott, J., Pèry, A.R.P., Ramil, M., Roennefahrt, I., Tarazona, J.V., Sàncchez-Arguello, P., Ternes, T.A., Trudeau, V.L., Boucard, T., Van Der Kraak, G.J. and Servosy M.R., 2011. Environmental Risk Assessment for the Serotonin Re-uptake Inhibitor Fluoxetine: Case Study Using the European Risk Assessment Framework. *Integrated Environmental Assessment and Management* 6, 524-539.
- ❖ Okey, A.B., Riddick, D.S. and Harper PA. 1994. The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. *Toxicol Lett* 70,1-22.
- ❖ Olive, P.L., 1988. DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 11, 487.
- ❖ Peakall, D. B., and L.R. Shugart, 1993. *Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health.* NATO ASI Series H: vol. 68, Springer-Verlag, Heidelberg.
- ❖ Pearse, A.G.E. 1972 *Histochemistry, theoretical and applied*, vol. 2. London: Churchill-Livingstone.
- ❖ Pereira, S.C.D., Martin-Diaz, M.L., Zanette, J., Cesar, A., Choueri, R. B., Moledo De Souza Abessa, D., Catharino, M.G.M., Vasconcellos, M.B.A., Dias Bairy, A.C., Pereira Moreira de Sousa, E.C., Angel Del Valls, T., 2011. Integrated biomarker responses as environmental status descriptors of a coastal zone (sao Paulo, Brazil). *Ecotox. Environ. Safe.* 74, 1257-1264.
- ❖ Pipe, R.K., 1993. The generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 111-122.
- ❖ Pohl, R.J. and Fouts, J.R., 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal Biochem* 107, 150-5.
- ❖ Poland, A. and Bradfield C., 1992. A brief review of the Ah locus. *Tohoku J Exp Med* 168, 83-7.
- ❖ Potera, C., 2000. Drugged drinking water, *Environ. Health Perspect.* 108, 446-449.

- ❖ Quinn, B., Gagnè, F., Blaise, C., 2004. Oxidative metabolism activity in *Hydra attenuata* exposed to carbamazepine. *Fresenius Environ Bull.* 13, 1-6.
- ❖ Ram, J.L., Crawford, G.W., Walker, J.U., Mojares, J.J., Patel, N., Fong, P.P., Kyojuka, K., 1993. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): Activation by internal or external application of serotonin. *J Exp Zool* 265, 587-598.
- ❖ Regoli, F., 1992. Lysosomal responses as a sensitive stress Index in biomonitoring heavy metal pollution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 83, 63-69.
- ❖ Roberts, P.H., Bersuder, P., 2006. Analysis of OSPAR priority pharmaceuticals using high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1134, 143-150
- ❖ Roberts, P.H., Thomas, K.V., 2006. The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the lower Tyne catchment, *Sci. Total Environ.* 356, 143-153.
- ❖ Sacher, F., Lange, F.T., Brauch, H.-J., Blankenhorn, I., 2001. Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany, *J. Chromatogr.* 938, 199-210.
- ❖ Santos, L.H., Araújo, A.N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M.C., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater* 175(1-3), 45-95.
- ❖ Schmidt, W., O'Rourke, K., Hernan, R., Quinn, B., 2011. Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus* spp.) and their comparison with standardized toxicity tests. *Marine Pollution bulletin.*
- ❖ 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. *Aquat. Toxicol.* 104, 38-47.
- ❖ Shugart, L.R., 1995. Environmental genotoxicology. In: Rand, G.M. (Ed.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment.* Taylor & Francis, Bristol, PA, pp. 405-420.
- ❖ Sijm, D.T.H.M., Opperhuizen, A., 1989. Biotransformation of organic chemicals by fish: enzyme activities and reactions. In: Hutzinger, O. (Ed.), *Handbook of Environmental Chemistry Reactions and Processes*, vol. 2E. Springer, Berlin, pp. 163- 235.

- ❖ Siu, W.H.L., Cao, J., Jack, R.W., Wu, R.S.S., Richardson, B.J., Xu, L., Lam, P.K.S., 2004. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquat. Toxicol.* 66, 381-392.
- ❖ Solé, M., Shaw, J.P., Frickers, P.E., Readman, J.W., Hutchinson, T.H., 2010. Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. *Anal Bioanal Chem* 396(2), 649-56.
- ❖ Speit, G., Hartmann, A., 1995. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10, 555-559.
- ❖ Stegeman, J.J. and Hahn, M.E., 1994. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspectives on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Malins DC and Ostrander GK (Eds.) *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 87-206.
- ❖ Stegeman, J.J. and Lech, J.J., 1991. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ Health Perspect* 90, 101-9.
- ❖ Stumpf, M., Ternes, T.A., Wilken, R.-D., Rodrigues, S.V., Baumann, W., 1999. Polar drug residue in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil, *Sci. Total Environ.* 225, 135-141.
- ❖ Terman, A., Brunk, U.T., 2004. Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36, 1400-1404.
- ❖ Ternes, T.A., 2001. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends. Anal. Chem.* 20, 419-434
- ❖ Van Gestel, C.A.M., Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology.* 5, 217-225.
- ❖ Vasskog, T., Berger, U., Samuelsen, P.-J., Kallenborn, R., Jensen, E., 2006. Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway, *J. Chromatogr. A* 1115, 187-195.
- ❖ Vassog, T., Anderssen, T., Pedersen-Bjergaard, S., Kallenborn, R., Jensen, E., 2008. Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. *J. Chromatogr.* 1185A, 194-205.

- ❖ Verenitch, S.S., Lowe, C.J., Mazumder, A., 2006. Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1116, 193-203.
- ❖ Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci. Review* 1, 295-317.
- ❖ Viarengo, A., Canesi, L., 1991. Mussel as biological indicators of pollutions. *Aquaculture*. 94, 225-243.
- ❖ Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146, 281-300.
- ❖ Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.* 104, 355-372.
- ❖ Vieno, N.M., Tuhkanen, T., Kronberg, L., 2006. Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* 1134, 101-111.
- ❖ Weigel, S., Kuhlmann, J., Hühnerfuss, H., 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibric acid, caffeine and DEET in the North Sea, *Sci. Total Environ.* 295, 131-141.
- ❖ WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria* 155, World Health Organization, Geneva.
- ❖ Whyte, J.J., Jung, R. E., Schmitt, C. J. and Tillitt D. E., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, 30(4),347-570.
- ❖ Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 19, 137- 161.
- ❖ Winzer, K., 2001. Oxidative stress in the marine environment prognostic tools for toxic injury in fish liver cells. *Academic Thesis, University of Amsterdam.*
- ❖ Wislocki, P.G., Miwa, M.T. and Yu, A.Y.H., 1980. Reactions catalyzed by the cytochrome P-450 system, in Jakoby, W.B., Ed., *Enzymatic Basis of Detoxication*, Vol. 1, Academic Press, New York, p.135.

- ❖ Zuccato, E., Castiglioni, S., Fanelli, R., Reitano, G., Bagnati, R., Chiabrando, C., Pomati, F., Rossetti, C., Calamari, D., 2006. Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 13, 15-21.
- ❖ Zwiener, C., Gremm, T.J., Frimmel, F.H., 2001. Pharmaceutical residues in the aquatic environment and their significance for drinking water production, in: K.Kümmerer (Ed.), *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, Springer, Berlin, pp. 81–89.